

Aus der Klinik für Allgemeine Chirurgie, Viszeral-, Gefäß- und Kinderchirurgie
Universitätsklinikum des Saarlandes, Homburg/Saar
Direktor: Herr Prof. Dr. med. M. K. Schilling
Doktorvater: Herr PD Dr. med. O. Kollmar

Einfluss des Stromal Cell-derived Factor (SDF)-1 auf Tumorstwachstum und Angiogenese kolorektaler Metastasen

Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

der Medizinischen Fakultät

der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

2008

vorgelegt von: Kathrin Rupertus

geboren am: 01.05.1981 in Quirschied/Saar

Dekan: Prof. Dr. med. M. D. Menger

Gutachter: 1.
2.
3.

Datum der Promotion:

Diese Arbeit ist meinem Großvater gewidmet

Inhaltsverzeichnis

Kapitel	Seitenzahl
1. Zusammenfassung	1
Zusammenfassung	1
Abstract	2
2. Einleitung	3
2.1 Das kolorektale Karzinom	3
2.2 Tumorprogression und Metastasierung	3
2.3 Leberresektion und –regeneration	7
2.4 Einfluss der Leberregeneration auf ruhende Tumorzellen	8
2.5 Chemokine	9
2.6 Stromal Cell-derived Factor (SDF)-1	10
2.7 Zielsetzung	12
3. Material und Methodik	13
3.1 Zellbiologische Methoden	13
3.2 Tierexperimentelles Modell	16
3.3 Intravital-Fluoreszenz-Mikroskopie	19
3.4 Tierexperimentelles Protokoll	22
3.5 Histologie und Immunhistochemie	24
3.6 Western Blot-Analyse	25
3.7 Statistik	27
4. Ergebnisse	28
4.1 CXCR4 / CXCR7-Expression auf CT26.WT-Zellen und Zellproliferation <i>in vitro</i>	28
4.2 SDF-1 vermittelte Tumorzellmigration <i>in vitro</i>	29
4.3 Bedeutung von SDF-1 für Tumorwachstum und Angiogenese <i>in vivo</i>	29
4.4 Tumorwachstum und Angiogenese unter SDF-1-Blockade nach Leberresektion	36
5. Diskussion	47
5.1 Lokale Wirkung von SDF-1 <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i>	47
5.2 Auswirkungen der SDF-1-Blockade auf kolorektale Metastasen nach Leberresektion	51
5.3 Schlussfolgerung	56

6. Literaturverzeichnis	57
7. Danksagung / Publikationen	69
8. Lebenslauf	73

1. Zusammenfassung

Das kolorektale Karzinom ist eine der häufigsten, zum Tode führenden Tumorerkrankungen weltweit, wobei die unkontrollierte metastatische Tumorausbreitung in der Regel die unmittelbare Todesursache der Patienten darstellt. Hierbei ist die Leber von einer Metastasierung am häufigsten betroffen. Das spezifische Milieu des Leberparenchyms begünstigt das Wachstum von Tumorzellen im Sinne eines „Homings“. Einer der wichtigsten gewebspezifischen Faktoren, welche dieses Tumorzellhoming steuern, ist der Stromal Cell-derived Factor (SDF)-1. Während die chemotaktische Wirkung von SDF-1 auf Tumorzellen bekannt ist, gibt es in der Literatur bisher keine Daten zur Wirkung von SDF-1 auf Tumorzellproliferation und Angiogenese *in vivo*. Dies wurde im ersten Teil der vorliegenden Arbeit anhand des Rückenhautkammer-Modells der Maus intravitalmikroskopisch untersucht. Der Goldstandard in der Therapie kolorektaler Lebermetastasen ist die chirurgische Resektion, wobei aktuell der Nutzen adjuvanter Chemotherapie-Protokolle nach Leberteilresektion evaluiert wird. Im zweiten Teil der Studie wurden daher die Auswirkungen der SDF-1-Blockade nach Leberresektion auf das Tumorwachstum in der Rückenhautkammer analysiert. In der vorliegenden Arbeit konnte die Expression der beiden SDF-1-Rezeptoren CXCR4 und CXCR7 auf den verwendeten Kolonkarzinomzellen nachgewiesen werden. Die Zellen zeigten *in vitro* eine dosisabhängige Migration entlang eines SDF-1-Gradienten. In den tierexperimentellen Studien kam es, vermittelt durch SDF-1, zu einer signifikanten Stimulation von Tumorwachstum und Tumorzell-Proliferation, bei gleichzeitiger Reduktion der Tumorzell-Apoptose. SDF-1 führte darüber hinaus zu einer vorübergehenden Erhöhung der Kapillardichte und zu einer signifikanten Dilatation der Tumorkapillaren im Vergleich zur Kontrolle. Die Blockade von SDF-1 nach Leberteilresektion im zweiten Teil der Studie hemmte das Tumorwachstum nicht-etablierter Metastasen nur initial. Es kam im Verlauf zu einer ausgeprägten, kompensatorischen Stimulation der Tumorangiogenese, welche mit einer erhöhten VEGF-Expression assoziiert war. Dies führte schließlich zu einer Beschleunigung des Metastasenwachstums. Histologisch zeigte sich, dass durch die Neutralisation von SDF-1 die Tumorzellapoptose verringert und das infiltrative Tumorwachstum verstärkt wurde. Diese Ergebnisse belegen somit, dass SDF-1 das Wachstum kolorektaler Tumormetastasen durch Stimulation der Tumorangiogenese fördert. Nach Leberresektion hemmt die Blockade von SDF-1 das Tumorwachstum aufgrund einer kompensatorischen Verstärkung der Angiogenese nicht dauerhaft. Dies lässt sich auf die Aktivierung einer alternativen, VEGF-abhängigen Signalkaskade zurückführen. Da SDF-1 offensichtlich von großer Bedeutung für das Wachstum kolorektaler Metastasen ist, sollte dieser Mechanismus weiter untersucht werden.

Abstract

Colorectal cancer is one of the leading causes of cancer-related mortality worldwide. Death of the patients usually results from uncontrolled metastatic disease. The liver is the most common site of metastatic seeding of colorectal cancer cells. Additionally, the tissue-specific environment within the liver parenchyma favors the outgrowth of metastatic tumor cells. The chemokine stromal cell-derived factor (SDF)-1 is one of the most important tissue-specific factors involved in tumor cell homing. In the literature, some evidence exists that SDF-1 also influences tumor cell proliferation and angiogenesis. In the first part of the presented study, metastatic tumor growth was analyzed after exposure to SDF-1 using the dorsal skinfold chamber model of the mouse. Tumor growth characteristics and angiogenesis were examined using intravital microscopy. In addition the chemotactic effects of SDF-1 on tumor cells was studied *in vitro*. The gold standard in the treatment of colorectal liver metastases is liver resection. However, the potential benefit of adjuvant chemotherapy after liver resection is currently evaluated. Therefore, in the second part of the presented study, the effects of SDF-1 neutralization after partial hepatectomy upon tumor growth were investigated. For that purpose, the animals were hepatectomized and tumor growth within the dorsal skinfold chamber was evaluated under continuous blockade of SDF-1 using intravital microscopy. First of all, the expression of both receptors for SDF-1, CXCR4 and CXCR7 could be demonstrated and tumor cells displayed a dose-dependent migration in response to SDF-1. In the *in vivo*-assay, peritumoral application of SDF-1 significantly enhanced local tumor growth and tumor cell proliferation, whereas tumor cell apoptosis was reduced. SDF-1 led to a transient increase of capillary density and dilation of tumor capillaries as compared to controls. Blockade of endogenous SDF-1 after partial hepatectomy only initially suppressed tumor growth of non-established metastases, followed by a compensatory stimulation of tumor angiogenesis which was associated with an increase of VEGF-expression. As a consequence, tumor growth was markedly accelerated. Tumor cell apoptosis was reduced after neutralization of SDF-1, whereas invasive tumor growth was enhanced. In conclusion, SDF-1 enhances the outgrowth of colorectal tumor metastases due to stimulation of tumor angiogenesis. Interestingly, blockade of SDF-1 after partial hepatectomy does not suppress tumor growth as a result of a compensatory stimulation of tumor angiogenesis. This is most probably due to the activation of an alternative, VEGF-dependent signaling pathway. As SDF-1 is obviously of major importance for the outgrowth of colorectal metastases, this mechanism should be further investigated.

2. Einleitung

2.1 Das kolorektale Karzinom

Das kolorektale Karzinom ist, für beide Geschlechter gleichermaßen, mittlerweile die zweithäufigste Krebserkrankung in Deutschland. Die Zahl der jährlichen Neuerkrankungen in Deutschland wird für Männer und Frauen jeweils auf etwas über 35.000 geschätzt. Mit einem prozentualen Anteil an der krebisbedingten Mortalität von etwa 13% bei den Männern und 15% bei den Frauen stellt es somit die zweithäufigste tumorbedingte Todesursache in der Bundesrepublik dar (Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. in Zusammenarbeit mit dem Robert-Koch-Institut, 2006). Dabei stellen die Primärtumoren dank guter chirurgischer Therapiemöglichkeiten heute nur noch selten die unmittelbare Todesursache dar, sondern es ist deren unkontrollierte metastatische Ausbreitung, die zum Tod betroffenen Patienten führt (Fong Y, 1999; Chambers AF et al., 2002; Abdalla EK et al., 2004). Das primäre Zielorgan der hämatogenen Metastasierung des kolorektalen Karzinoms ist die Leber, sekundär werden auch andere Organe wie Lunge, Knochen und Gehirn befallen (Weiss L et al., 1986). Trotz guter Möglichkeiten zur Früherkennung, z.B. durch die Koloskopie, sind bei über 50% aller Patienten entweder bereits bei der Erstdiagnose oder im weiteren Krankheitsverlauf Lebermetastasen nachweisbar. Extrahepatische Metastasen finden sich bei fortgeschrittenen Tumorstadien ebenfalls in etwa der Hälfte der Fälle (Fong Y, 1999; Abdalla EK et al., 2004). Allein die chirurgische Resektion von solitären Leber- und Lungenmetastasen kann momentan als kuratives Therapieverfahren betrachtet werden. Dank zunehmender Erfahrung und technischer Weiterentwicklung ist die Leberteilresektion in spezialisierten Zentren mittlerweile ein etabliertes Standardverfahren mit vergleichsweise geringer perioperativer Morbidität und Mortalität (Jarnagin WR et al., 2002; Imamura H et al., 2003; Seyama Y et al., 2003; Chang YC, 2004). Obwohl bei sorgfältiger Indikationsstellung und radikaler Metastasenresektion die 5-Jahres-Überlebensrate von Patienten mit Lebermetastasen auf bis zu 50% gesteigert werden kann, kommt es sehr häufig zu Rezidiven der Filiae, welche sowohl intra- als auch extrahepatisch lokalisiert sein können (Fong Y et al., 1999; Yamamoto J et al., 1999; Abdalla EK et al., 2004). Adjuvante Therapiestrategien um diese hohe Rezidivrate zu senken, sind aktuell Gegenstand zahlreicher klinischer und experimenteller Studien (Mizutani J et al., 1992; Slooter GD et al., 1995; Drixler TA et al., 2000; Tsuchiya Y et al., 2003; Abdalla EK et al., 2004).

2.2 Tumorprogression und Metastasierung

Hämatogene Fernmetastasen von soliden Tumoren sind Ausdruck der systemischen Ausbreitung von malignen Zellen und somit, im Gegensatz zum Primärtumor, durch eine

reine Lokalthherapie, wie die chirurgische Resektion oder Bestrahlung, in der Regel nicht heilbar. Die erfolgreiche Behandlung von fortgeschrittenen, metastasierten Tumorstadien erfordert ein multimodales Therapiekonzept und stellt daher nach wie vor die größte Herausforderung in der chirurgischen und internistischen Onkologie dar. Bis zur Ausbildung von klinisch nachweisbaren Filiae umfasst der Vorgang der hämatogenen Metastasierung die folgenden, pathophysiologisch bedeutsamen Schritte (Chambers AF et al., 2002).

2.2.1 Metastasierung von Tumorzellen

An erster Stelle im Metastasierungsprozess stehen Stromainvasion und Eindringen der Tumorzellen in das Gefäßbett des Wirtsgewebes. Diese Vorgänge erfordern die Durchdringung der Basalmembran und der verschiedenen Gewebekompartimente durch die metastatischen Zellen. Von besonderer Bedeutung sind hierbei unter anderem von Tumorzellen produzierte Matrix-Metalloproteinasen (MMPs), welche für die Degradation der extrazellulären Matrix verantwortlich sind (Chambers AF et al., 1997; McDonnell S et al., 1999). Darüber hinaus spielen chemotaktische Faktoren, sogenannte Chemokine, welche die Migration und die Zellmotilität regulieren eine entscheidende Rolle (Müller A et al., 2001; Kassis J et al., 2001; Chambers AF et al., 2002). Sind die Zellen erfolgreich in das Gefäßbett eingedrungen, entscheiden zunächst die hämodynamischen und physikalischen Gegebenheiten darüber, in welches Kapillarbett sie zuerst eingeschwemmt werden und extravadiere können (Luzzi KJ et al., 1998; Chambers AF et al., 2002). Vor allem in den Kapillaren von Lunge und Leber werden die Tumorzellen allein aufgrund ihrer Größe sehr effektiv zurückgehalten und können so in großer Zahl ins Gewebe eindringen (Morris VL et al., 1993; Morris VL et al., 1997; Luzzi KJ et al., 1998; Chambers AF et al., 1998/99). Allerdings setzt die Etablierung einer klinisch manifesten Tumormetastase neben der Proliferation eingedrungener Zellen auch die Ausbildung einer funktionellen Gefäßversorgung voraus (Gimbrone MA et al., 1972; Luzzi KJ et al., 1998; Kerbel RS, 2000; Bergers G et al., 2003). Dieser Vorgang ist der kritischste Schritt des bis dahin äußerst effektiven Metastasierungsprozesses. Wie Luzzi und Mitarbeiter anhand portalvenös injizierter Melanomzellen zeigen konnten, überlebten zwar 80% dieser Zellen im Kapillarbett der Leber und drangen in das Lebergewebe ein, allerdings führte durchschnittlich nur eine von 40 Zellen zur Ausbildung einer Mikrometastase und nur eine von 100 solcher Mikrometastasen wuchs innerhalb von 13 Tagen zu einem makroskopisch erkennbaren Tumor heran. Die im Lebergewebe verbliebenen Einzelzellen befanden sich größtenteils in einem Ruhezustand und zeigten in der Immunhistochemie eine Proliferationsrate von nur 2% (Luzzi KJ et al., 1998). Diese ruhenden Einzelzellen und Mikrometastasen stellen einen möglichen Ausgangspunkt für Tumorrezidive dar (Panis Y et al., 1992; Guba M et al., 2001). Die Ineffektivität dieses letzten Schrittes der Tumormetastasierung lässt auf den Einfluss

zahlreicher Gewebefaktoren schließen, deren Identifizierung noch immer nicht abgeschlossen ist und deren mögliche klinische und therapeutische Bedeutung zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht vollständig überblickt werden kann (Morris VL et al., 1997; Müller A et al., 2001; Chambers AF et al., 2002).

2.2.2 Organspezifität der Metastasierung

Obwohl nach dem Eindringen von Tumorzellen in das Gefäßbett zunächst die intravasalen physikalischen Gegebenheiten über deren primäre Aussaat bestimmen, lässt sich das Muster der metastatischen Absiedelungen verschiedener Arten von soliden Tumoren nicht allein durch Hämodynamik erklären (Weiss L, 1992). Bereits 1889 vertrat Stephen Paget die Ansicht, dass metastatisches Tumorwachstum nur auf geeignetem „Boden“ möglich und somit organspezifisch ist (Paget S, 1989). Von Pagets Veröffentlichung leitet sich die sogenannte „Seed and Soil“-Theorie, als Erklärung für das offensichtlich nicht zufällige Ausbreitungsmuster von Filiae unterschiedlicher Primärtumoren ab. Diese betonte zum ersten Mal die entscheidende Bedeutung gewebsspezifischer Faktoren auf das Tumorwachstum (Chambers AF et al., 2002; Müller MM et al., 2004). Gestützt wird diese Theorie unter anderem dadurch, dass gleichartige Tumorzellen, abhängig vom Ort ihrer Implantation, unterschiedliche Wachstumsmuster zeigen (Fukumura D et al., 1997). In diesem Zusammenhang konnten Orimo et al. zeigen, dass nicht-neoplastische, tumorassoziierte Fibroblasten durch Sekretion des Chemokins SDF-1 Wachstum und Neoangiogenese von humanen Mammakarzinomen fördern (Orimo A et al., 2005).

Ausgehend von der „Seed and Soil“-Theorie eröffnen sich interessante Strategien in der Therapie metastatischer Tumoren, die sich nicht primär gegen die Tumorzellen selbst („Seed“) richten, sondern die Filiae durch Modulation des Wirtsgewebes („Soil“) am Wachstum hindern sollen. So hat sich beispielsweise gezeigt, dass Bisphosphonate in der Therapie ossärer Metastasen des Mammakarzinoms nicht nur die Frakturhäufigkeit betroffener Knochen herabsetzen, sondern anscheinend durch ihren Einfluss auf den Knochenstoffwechsel auch anti-metastatische Eigenschaften besitzen (Diel IJ et al., 2000).

2.2.3 Bedeutung der Tumorangiogenese

Das Wachstum von einzelnen Tumorzellen und Mikrometastasen zu klinisch relevanten Filiae erfordert neben dem proliferativen Stimulus auch die Ausbildung eines funktionellen Gefäßsystems. Die begrenzte Diffusionskapazität für Nährstoffe und Sauerstoff und die Akkumulation von toxischen Stoffwechselprodukten limitiert das Heranwachsen der meisten gefäßlosen, soliden Tumoren auf einen kritischen Durchmesser von nur wenigen Millimetern (Gimbrone MA et al., 1972; Carmeliet P et al., 2000; Kerbel RS, 2000; Vajkoczy P et al., 2002). Diese ruhenden Tumoren oder in-situ-Karzinome sind klinisch stumm und

beeinträchtigen weder den Allgemeinzustand, noch die Lebenserwartung der betroffenen Patienten. Unter bestimmten Bedingungen kann es jedoch, getriggert durch Gewebshypoxie und die Aktivierung von Onkogenen, im Tumorgewebe zum Überwiegen der pro-angiogenen Signale gegenüber den anti-angiogen wirkenden Faktoren kommen (Bergers G et al., 2003). Ausgelöst wird dies unter anderem durch die Ausschüttung sogenannter Hypoxia-inducible factors (HIFs), durch die Abnahme des Gewebs- pO_2 (Maxwell PH et al., 2001). Durch das Aussprossen von neuen Gefäßschläuchen aus vorhandenen Kapillaren und postkapillären Venolen des Wirtsgewebes, die Expansion des Kapillargeflechts durch Interposition von Tumorzellen oder auch das Einwandern von endothelialen Vorläuferzellen (EPCs) in den Tumor, kommt es zur Ausbildung eines tumoreigenen Gefäßnetzes (Carmeliet P et al., 2000; Okamoto R et al., 2005). Dieser kritische Schritt der Tumorprogression wird auch als „Angiogenic Switch“ bezeichnet (Bergers G et al., 2003). Inzwischen ist bereits eine große Anzahl der an der Regulation der Angiogenese mutmaßlich beteiligten Faktoren und Rezeptoren identifiziert. Bekannte Angiogenese-Aktivatoren sind z.B. Vascular endothelial growth factor (VEGF), basic Fibroblast growth factor (bFGF) und Hepatocyte growth factor (HGF), zu den Angiogenese-Inhibitoren zählen unter anderem Angiostatin, Platelet factor (PF)-4 und Interleukin (IL)-12 (Carmeliet P et al., 2000; Kerbel RS, 2000, Bergers G et al., 2003).

Da avaskuläre Tumorstadien die Lebenserwartung des betroffenen Organismus in der Regel nicht beeinträchtigen, eröffnete die Identifizierung der Regulatoren der Neoangiogenese und die Entwicklung von anti-angiogenen Wirkstoffen vielversprechende Therapieoptionen in der Onkologie. Seit 2005 ist europaweit mit Bevacizumab ein monoklonaler Antikörper gegen VEGF für die Erstlinien-Therapie von Patienten mit metastasiertem kolorektalen Karzinom zugelassen, nachdem in zwei randomisierten, placebokontrollierten Studien die Überlegenheit der Kombinationstherapie mit Bevacizumab gegenüber der Standard-Chemotherapie nachgewiesen werden konnte (Hurwitz H et al., 2004; Kabbinavar FF et al., 2005). Daneben werden mittlerweile auch andere anti-proliferativ und/oder anti-angiogen wirkende monoklonale Antikörper und „small molecules“ in der onkologischen Therapie eingesetzt, wie z.B. der Epidermal growth factor (EGF)-Rezeptor-Antikörper Cetuximab beim metastasierten Kolonkarzinom oder der synthetische Tyrosinkinaseinhibitor Imatinib bei der chronisch myeloischen Leukämie. Da an der Regulation der Tumorzellproliferation und Neoangiogenese zahlreiche Proteine und deren Rezeptoren beteiligt sind, eignet sich diese gezielte molekulare Therapie meist nicht als Monotherapie, sondern ist nur in Kombination mit einer konventionellen zytostatischen Therapie sinnvoll. Für den kombinierten Einsatz molekularer Substanzen müssen die zu Grunde liegenden Regulationsmechanismen weiter detailliert erforscht werden (Raida M, 2006).

2.3 Leberresektion und -regeneration

Die Leber, als zentrales Entgiftungsorgan des Körpers, ist nach Resektion imstande das verlorene Parenchym, unter Aufrechterhaltung ihrer biologischen Funktionen, innerhalb kurzer Zeit zu regenerieren (Michalopoulos GK et al., 1997; Taub R, 2004). In der gesunden, nicht vorgeschädigten Leber wird das chirurgisch resezierte Gewebe durch Proliferation der Hepatozyten und der nicht-parenchymatösen Zellpopulationen funktionell vollwertig ersetzt, bei gleichzeitig erhaltener Syntheseleistung der Restleber (Michalopoulos GK et al., 1997). Reife Hepatozyten und die übrigen hepatischen Zellpopulationen werden unter dem Einfluss zahlreicher Wachstumsfaktoren und Zytokine zur Proliferation angeregt (Scotté M et al., 1997; Stolz DB et al., 1999; Taub R, 2004). Bereits wenige Stunden nach Leberresektion steigen die Serumkonzentrationen verschiedener Proteine, wie z.B. HGF, EGF, Transforming growth factor (TGF)- α und VEGF, welche unter anderem als mitogene und angiogene Faktoren wirken (Michalopoulos GK et al., 1997; Taub R, 2004; Shimizu H et al., 2005). Das Ausmaß der Regeneration ist proportional zum Parenchymverlust und äußerst präzise reguliert, sodass die korrekte Lebergröße wieder erreicht wird (Michalopoulos GK et al., 1997). Um eine funktionelle neue Zytoarchitektur zu etablieren, erfordert die Leberregeneration auch die Synthese von nicht-parenchymatösem Stroma und die ausreichende Gefäßversorgung des proliferierenden Parenchyms. Somit ist dieser Prozess eng an die Anwesenheit angiogener Faktoren gebunden (Michalopoulos GK et al., 1997; Drixler TA et al., 2002). Trotz intensiver Forschung sind die genauen Mechanismen, die diesen Regenerationsprozess so präzise regulieren, bis heute noch nicht vollständig aufgeklärt.

Zudem unterscheiden sich die zu Grunde liegenden Reparaturmechanismen auch in Abhängigkeit von der Art der vorherrschenden Gewebeschädigung. So führen beispielsweise toxische, metabolische oder infektiöse Noxen zu anderen Gewebsreaktionen, als ein reiner Parenchymverlust bei einer gesunden Leber (Taub R, 2004). Im Rahmen besonders schwerer und/oder chronischer Leberschädigung konnte beispielsweise die Beteiligung hämatopoietischer Stammzellen, die dem Knochenmark entstammen und in die geschädigte Leber einwandern, an deren Regeneration nachgewiesen werden (Kollet O et al., 2003; Gehling UM et al., 2005; Dalakas E et al., 2005). Im Bereich der terminalen Gallengänge der Leber existiert zudem eine, auf Grund ihrer Zytomorphologie als „Oval Cells“ bezeichnete Population bipotenter Zellen, die zur Differenzierung in Hepatozyten oder Cholangiozyten fähig ist. Diese Zellen sind im Rahmen schwerer Gewebeschädigung wahrscheinlich ebenfalls an der Leberregeneration beteiligt, sodass heute als Regenerationspool ein Drei-Kompartiment-Modell, bestehend aus reifen Hepatozyten, „Oval Cells“ und hämatopoietischen Stammzellen, postuliert wird (Mavier P et al., 2004; Gehling UM et al., 2005; Dalakas E et al., 2005).

2.4 Einfluss der Leberregeneration auf ruhende Tumorzellen

Wie bereits erläutert, verbessert die radikale Resektion von solitären Lebermetastasen die 5-Jahres-Überlebensrate betroffener Patienten auf bis zu 50% (Fong Y et al., 1999; Yamamoto J et al., 1999). Im Tierexperiment konnte zudem nachgewiesen werden, dass eine 40%ige Leberresektion (Phx) das Überleben von Mäusen mit diffusen kolorektalen Lebermetastasen signifikant verlängert (Castillo MH et al., 1989). Dies ist möglicherweise bedingt durch eine erhöhte Interferon-Produktion durch nicht-parenchymatöse Leberzellen und dessen anti-proliferative Wirkung auf Adenokarzinomzellen (Doerr R et al., 1989). Andererseits zeigte sich in den Arbeiten von Yokoyama et al., dass nur eine 60%ige Phx das intrahepatische Wachstum von Zellen eines hepatozellulären Karzinoms supprimierte, während eine 30%ige Phx sogar zu verstärktem Tumorwachstum führte (Yokoyama H et al., 2000). In anderen Studien kam es sowohl nach 30%, als auch nach 70%iger Phx zu verstärktem Metastasenwachstum (Paschkis KE et al., 1955; Fisher B et al., 1959; van Dale P et al., 1988; Mizutani J et al., 1992; Panis Y et al., 1992; DeJong KP et al., 1995; Slooter GD et al., 1995; Picardo A et al., 1998; Rashidi B et al., 1999). Dieses beschleunigte Tumorwachstum nach Phx lässt sich unter anderem auf die Ausschüttung von Wachstumsfaktoren im Rahmen der Leberregeneration zurückführen (Scotté M et al., 1997; Picardo A et al., 1998). So konnten Shimizu und Mitarbeiter in einem Rattenmodell, 72 Stunden nach Durchführung einer 70%igen Phx, eine 5fach erhöhte Expression von VEGF-mRNA im Lebergewebe nachweisen. Zeitverzögert dazu zeigte sich darüber hinaus eine bis zu 2,5fach höhere Expressionsrate für Angiopoietin (Ang)-1-mRNA. Die Expression von Ang-2-mRNA war 120 Stunden nach Phx sogar um das 21fache gesteigert (Shimizu H et al., 2005).

Während mittlerweile zahlreiche Studien darauf hindeuten, dass die Leberresektion intrahepatisches Tumorwachstum verstärkt, sind die möglichen Auswirkungen der Leberregeneration auf extrahepatische Metastasen weiterhin umstritten. So konnten beispielsweise DeJong et al. keine Stimulation des Wachstums von subkapsulär renal und retroperitoneal implantierten hepatozellulären Karzinomzellen nach Phx feststellen, während es in anderen Studien bei subkutan injizierten Zellen zu einer deutlichen Wachstumsbeschleunigung kam (DeJong KP et al., 1995; Schindel DT et al., 1997). In unseren eigenen Untersuchungen konnten wir zeigen, dass eine 30%ige Leberresektion lediglich zu einer leichten Wachstumsverstärkung einer, in die Rückenhautkammer der Maus implantierten kolorektalen Tumormetastase führte, während die 70%ige Phx eine erhebliche Zunahme von Tumorzellmigration, Neoangiogenese und Tumorwachstum auslöste (Rupertus K et al., 2007). Unsere Ergebnisse belegen somit, dass es sich bei dem Prozess der Leberregeneration nicht nur um einen auf die Leber beschränkten Vorgang handelt, sondern dass dieser vielmehr eine Reihe klinisch äußerst bedeutsamer, systemischer Folgeerscheinungen auszulösen vermag. Aus diesem Grund sind die, bei Patienten mit

hepatisch metastasierten kolorektalen Karzinomen auch nach radikaler Metastasenresektion häufigen Tumorrezidive zu einem großen Teil auf den Einfluss der im Rahmen der Leberregeneration ausgeschütteten Wachstumsfaktoren zurückzuführen. Den Ausgangspunkt für Rezidive können in diesem Zusammenhang die bereits beschriebenen ruhenden Tumorzellen oder Tumorzellnester sowie avaskuläre Mikrometastasen in klinisch gesundem Lebergewebe darstellen, welche sich der prä- oder intraoperativen Diagnostik entziehen (Fisher B et al., 1959; Gimbrone MA et al., 1972; Panis Y et al., 1992; De Jong KP et al., 1995; Chambers AF et al., 2002). In experimentellen Studien konnte die stimulierende Wirkung der Phx auf das Tumorstadium durch Applikation verschiedener Faktoren, wie Tumor necrosis factor (TNF)- α oder Angiostatin deutlich reduziert werden (Slooter GD et al., 1995; Drixler TA et al., 2000). Dennoch ist bisher der Schritt vom experimentellen Modell zur klinischen Anwendung noch nicht erfolgt.

2.5 Chemokine

Im Zusammenhang mit der Untersuchung der Regulationsmechanismen, die bestimmen, ob Tumorzellen ruhen oder proliferieren und ihr angiogenes Potential entfalten, sind in den letzten Jahren chemotaktische Zytokine, so genannte Chemokine, zunehmend Gegenstand der Grundlagenforschung geworden (Rottman JB, 1999). Chemokine sind kleine Proteine mit einem Molekulargewicht zwischen 8 und 12 kD, deren gemeinsames Charakteristikum das Vorhandensein der so genannten Chemokindomäne ist, welche aus 4 Cysteinen in einer hochkonservierten Position besteht. Anhand dieser Cysteine lassen sich die Chemokine in 4 Unterfamilien einteilen. Je nachdem, ob die beiden dem N-terminalen Ende des Proteins am nächsten liegenden Cysteine durch eine oder mehrere andere Aminosäuren (mit X bezeichnet) voneinander getrennt sind, unterscheidet man C, CC, CXC und CX₃C Chemokine. Die unterschiedlichen Wirkungen der Chemokine werden durch die unterschiedlichen Chemokin-Rezeptoren vermittelt, die zur Gruppe der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren mit 7 Transmembrandomänen gehören (Rollins BJ, 1997). Obwohl die Chemokine ursprünglich als Entzündungsmediatoren im Rahmen der Untersuchung der Migration und des Recruitments von Leukozyten entdeckt und untersucht wurden, hat sich mittlerweile gezeigt, dass ihnen und ihren jeweiligen Rezeptoren darüber hinaus auch bei der Steuerung von Immunreaktionen, bei Infektionskrankheiten, in der Embryonalentwicklung und vor allem bei Tumorerkrankungen eine Schlüsselfunktion zukommt (Rollins BJ, 1997; Rottman JB, 1999, Balkwill F, 2003). Die selektive Blockade oder Modulation von Chemokinen und deren Rezeptoren erscheint daher als vielversprechende Therapieoption in der Behandlung infektiöser, entzündlicher und neoplastischer Erkrankungen (Tannenbaum

CS et al., 1996; Schneider GP et al., 2001; Homey B et al., 2002; Houshmand P et al., 2003).

Innerhalb der Gruppe der CXC-Chemokine, deren Gene, bis auf eine Ausnahme, auf dem langen Arm des Chromosoms 4 liegen, können wiederum 2 Untergruppen unterschieden werden: ELR+ CXC-Chemokine besitzen zwischen ihrem N-terminalen Ende und dem ersten der 4 Cysteine die Aminosäuresequenz Glutamat-Leucin-Arginin, die als ELR-Motiv bezeichnet wird. CXC-Chemokine, die dieser Gruppe angehören, zeichnen sich durch relativ einheitliche Funktionen aus. Sie wirken ausgeprägt chemotaktisch und aktivierend auf neutrophile Granulozyten und Endothelzellen und besitzen daher inflammatorische und angiogene Eigenschaften (Strieter RM et al. 1995; Rollins BJ, 1997; Dias S et al., 2001). Der Prototyp eines ELR+ CXC-Chemokins ist Interleukin (IL)-8 (= CXCL8 nach neuer Nomenklatur), daneben gehören auch Growth-regulated oncogene (GRO)- α - γ (= CXCL1-3), Epithelial-neutrophil activating peptide (ENA)-78 (= CXCL5) und Granulocyte chemotactic protein (GCP)-2 (= CXCL6) zu dieser Gruppe.

Dagegen wirken Non-ELR CXC-Chemokine, zu denen Platelet factor (PF)-4(= CXCL4), Monokine induced by interferon- γ (MIG) (= CXCL9), Interferon- γ -inducible protein (IP)-10 (CXCL10) und Stromal cell-derived factor (SDF)-1(= CXCL12) zählen, eher chemotaktisch auf Monozyten und T-Lymphozyten, während ihre Wirkung auf Neutrophile eher schwach ausgeprägt ist. PF4 und IP10 scheinen daneben durch Inhibition der Endothelzellchemotaxis und –proliferation angiostatisch zu wirken (Rollins BJ, 1997; Moore BB et al., 1998; Dias S et al., 2001). Für SDF-1 hingegen wurde in aktuelleren Publikationen eine angiogene Wirkung nachgewiesen (Salcedo R et al., 1999; Murdoch C, 2000). Insgesamt ist die Wirkung der Non-ELR-CXC-Chemokine jedoch weit weniger einheitlich als die der ELR+ CXC-Chemokine.

2.6 Stromal Cell-derived Factor (SDF)-1

Das beim Menschen und bei der Maus vorhandene und in seiner Aminosäuresequenz zu 99% identische Chemokin SDF-1 nimmt in der Gruppe der CXC-Chemokine eine Sonderstellung ein. Im Gegensatz zu den Genen der übrigen Vertreter dieser Chemokin-Familie ist der codierende Genabschnitt für SDF-1 auf Chromosom 10 lokalisiert (Shirozu M et al., 1995; Rollins BJ, 1997; Murdoch C, 2000). Zudem wird SDF-1, im Unterschied zu anderen Chemokinen, von Stromazellen vieler Organe sowie Fibroblasten produziert und ist daher in unterschiedlichen Konzentrationen nahezu ubiquitär nachweisbar (Jordan NJ et al., 1999; Burger JA et al., 2006). Die Expression von SDF-1 ist darüber hinaus konstitutiver Natur und nicht der Regulation durch inflammatorische Zytokine unterworfen (Murdoch C, 2000). Organe mit physiologisch hohen Konzentrationen dieses Chemokins sind Leber,

Lunge, Pankreas, Ovar und lymphatische Organe, wie Lymphknoten, Milz, Thymus und Knochenmark. Geringer ist seine Expression dagegen in Gehirn, Kolon, Niere, Haut und Skelettmuskulatur (Salcedo R et al., 1999; Murdoch C, 2000; Jordan NJ et al., 1999; Müller A et al., 2001; Lee BC et al., 2004). Unterschiedlich hohe Konzentrationen SDF-1 finden sich daneben in den malignen Zellen zahlreicher hämatologischer und solider Neoplasien (Murdoch C, 2000; Müller A et al., 2001; Moore MAS, 2001; Orimo A et al., 2005; Burger JA, 2006). Der Nachweis von höheren SDF-1-Konzentrationen in bestimmten Tumorgeweben, verglichen mit deren gesundem Ursprungsgewebe, lässt auf die Stimulation der SDF-1-Produktion im Rahmen der Tumorentstehung und -progression schließen (Lee BC et al., 2004). Eine starke Expression von SDF-1 in Mammakarzinomen ist mit gesteigerter Migration der Tumorzellen, verstärkter Tendenz zur lymphogenen und hämatogenen Aussaat und dadurch mit einer schlechteren Prognose assoziiert (Kang H et al., 2005). Bei Patienten mit kolorektalen Karzinomen ist eine fehlende Expression des SDF-1 Rezeptors CXCR4 und VEGF in Primärtumoren und in Metastasen ein starker Prognosefaktor für deren krankheitsfreies Überleben (Ottaviano A et al., 2006). Das Chemokin SDF-1 wird dabei nicht nur von den Tumorzellen selbst, sondern auch von nicht-neoplastischen Stromazellen produziert, die auch als carcinoma-associated fibroblasts (CAFs) bezeichnet werden (Kang H et al., 2005; Orimo A et al., 2005).

SDF-1 bindet an zwei Rezeptoren, CXCR4 und den erst kürzlich entdeckten CXCR7-Rezeptor, welche beide zur Gruppe der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren mit 7 Transmembrandomänen gehören (Rollins BJ, 1997; Murdoch C, 2000; Burns JM et al., 2006). Für CXCR4 ist SDF-1 dabei bislang der einzige bekannte Ligand. CXCR4 wird unter anderem auf hämatopoietischen Stammzellen, Leukozyten, Lymphozyten, Monozyten, Endothelzellen, Epithelzellen verschiedener Organe, wie Kolon und Lunge sowie auf zahlreichen malignen Zell-Linien exprimiert, darunter die hier verwendete CT26.WT Kolonkarzinom-Zelllinie (Salcedo R et al., 1999; Murdoch C, 1999; Koshiba et al., 2000; Murdoch C et al., 2000; Moore MAS, 2001; Zeelenberg IS et al., 2003; Lee BC et al., 2004; Burger JA et al., 2006). Die CXCR4 Expression wird durch verschiedene Zytokine reguliert. So kann z.B. unter Stimulation mit VEGF, bFGF, TNF α oder IL4 ein Anstieg, unter Einfluss von IL10 und IFN γ ein Abfall der Expression von CXCR4 nachgewiesen werden (Salcedo R et al., 1999; Murdoch C, 2000; Helbig G et al., 2003).

Die intrazelluläre Signalkaskade, die nach Bindung von SDF-1 ausgelöst wird, erfolgt sowohl über ein G γ -Protein, als auch über alternative Signaltransduktionswege. Die dadurch ausgelösten Effekte sind vielfältig und können aus diesem Grund bei verschiedenen Zellarten unterschiedliche Wirkungen entfalten (Rollins BJ, 1997; Tilton B et al., 2000; Vlahakis SR et al., 2002; Zeelenberg IS et al., 2003; Lee BC et al., 2004). Die bisher untersuchten Mechanismen und Auswirkungen der Interaktion des Liganden SDF-1 mit seinem Rezeptor

CXCR4 auf unterschiedliche Arten von Zellen sind ebenso vielfältig wie die Funktion, die ihr in zahlreichen (patho-)physiologischen Prozessen zugeschrieben wird und die insbesondere für Tumorerkrankungen relevant sind.

2.7 Zielsetzung

Obwohl einige Studien darauf hindeuten, dass der CXCR4-Rezeptor möglicherweise in den Metastasierungsprozess des kolorektalen Karzinoms involviert ist, wurde die funktionelle Rolle von SDF-1 bisher noch nicht aufgeklärt. Im ersten Teil der vorliegenden Studie wurde daher, nach erfolgreichem Nachweis der CXCR4 und CXCR7 Rezeptorexpression auf den CT26.WT-Tumorzellen, zunächst der Einfluss von SDF-1 auf die Tumorzellmigration *in vitro* untersucht. Darüber hinaus wurde anhand eines Mausmodells analysiert, ob SDF-1 die Angiogenese und das Tumorwachstum etablierter extrahepatischer Metastasen *in vivo* beeinflusst.

Es gibt zudem Hinweise, dass SDF-1 unter bestimmten Bedingungen in den Regenerationsprozess der Leber nach Leberresektion involviert ist (Mavier P et al., 2004; Zheng D et al., 2006). Obwohl bekannt ist, dass durch den Regenerationsprozess nach Leberresektion das Wachstum von intra- und extrahepatischen Metastasen stimuliert wird und diese Wachstumsstimulation vom Resektionsausmaß abhängt (Harun N et al., 2007; Rupertus K et al., 2007), gibt es bisher keine Informationen in der Literatur, ob die SDF-1/CXCR4-Signalkaskade in diesen Prozess involviert ist. Aus diesem Grund wurde im zweiten Teil der Studie untersucht, inwieweit die Blockade von SDF-1 nach Leberresektion die Angiogenese und das Tumorwachstum extrahepatischer kolorektaler Metastasen beeinflusst.

3. Material und Methodik

3.1 Zellbiologische Methoden

3.1.1 Tumorzell-Linie

Für die Experimente wurden Tumorzellen der Kolonkarzinomzell-Linie CT26.WT (ATCC CRL-2638, LGC Promochem GmbH, Wesel, Deutschland) verwendet. Die Zell-Linie entstammt einem N-Nitroso-N-Methylurethan-induzierten, undifferenzierten Adenokarzinom des Kolons und ist syngen zur BALB/c-Maus. In zahlreichen Publikationen hat sie sich bereits als syngenes Modell mit guter Tumorgenität bei der BALB/c-Maus bewährt (Wang M et al., 1995; Tannenbaum CS et al., 1996; Zeelenberg IS et al., 2003; Kollmar O et al., 2004, Kollmar O et al., 2006). Die CT26.WT-Zellen wurden in der Zellkultur als Monolayer in RPMI-1640 Medium mit 2 mM L-Glutamin (Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland), 10% FCS (Fetal calf serum, FCS-Gold, PAA Laboratories GmbH, Cölbe, Deutschland), 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin (PAA Laboratories GmbH) kultiviert und bei 37°C in einer humiden 5%igen CO₂-Atmosphäre inkubiert.

3.1.2 GFP-Transfektion der CT26.WT-Zellen

Um die Beurteilung der Tumorausdehnung und -entwicklung auch ohne wiederholte Farbstoffapplikation zu ermöglichen, wurden Tumorzellen genutzt, die Green fluorescent protein (GFP) exprimieren und somit sowohl *in vitro*, als auch *in vivo* mit einem speziellen Lichtschwellenfilter sichtbar gemacht werden können.

Mit Hilfe von CLONfectin (Clontech, Palo Alto, CA, USA) wurden die Zellen mit dem enhanced-GFP-Expressionsvektor pEGFP-N1 (Clontech) gemäß der Anleitung des Herstellers transfiziert (Kollmar O et al., 2004). Die Selektion der erfolgreich transfizierten Zellen wurde durch Zusatz von Kanamycin durchgeführt. Anschließend wurden die Zellen kultiviert und bis zur weiteren Verwendung bei -180°C in Flüssigstickstoff kryokonserviert. Dem Kulturmedium wurden hierzu 10% DMSO (Sigma Aldrich Chemie GmbH) und 50% FCS zugesetzt um eine Zell-Lyse zu verhindern. Zur erneuten Kultivierung wurden die CT26.WT-GFP-Zellen in 37°C temperierten Wasser aufgetaut, in Kulturmedium überführt und zur Kultivierung in Petrischalen (Cellstar, 100/20 mm, Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland) ausgesät und inkubiert. Alle zwei Tage erfolgte ein Medienwechsel. Alle zellbiologischen Arbeiten wurden unter sterilen Bedingungen an einer Sterilbank (Mikroflow Biological Safety Cabinet, Nunc Intermed, Wiesbaden, Deutschland) durchgeführt.

3.1.3 Kultivierung der Tumorzellen

Zur Vermehrung wurden die Zellen bei einer 70-80%igen Konfluenz passagiert. Dazu wurden sie zunächst mit sterilem PBS gespült und zur Ablösung von den Kulturschalen mit einer Trypsin-EDTA-Lösung (0,05% Trypsin; 0,02% EDTA; PAA) versetzt. Der Ca^{2+} -bindende Komplexbildner EDTA verstärkt die Trypsinwirkung, wodurch eine Loslösung der Zellen ohne größeren Verlust an Oberflächenmolekülen möglich ist. Nach Inkubation bei 37°C und mikroskopischer Kontrolle der Enzymwirkung erfolgte die Neutralisation mit FCS-haltigem Medium. Danach wurden die Zellen durch Zentrifugieren (Universal 30 F, Hettlich, Tuttlingen, Deutschland) gewaschen, anschließend im Verhältnis 1:2 ausgedünnt und bis zur nächsten ausreichenden Konfluenz kultiviert. Für die Experimente wurden ausschließlich Zellen der ersten drei Passagen nach Kryo-Konservierung verwendet. Für die Herstellung des Pellets wurden die Zellen zunächst, wie zuvor beschrieben, mit Trypsin aus der Kulturschale gelöst, mit PBS gewaschen und danach 3 x für jeweils 3 min bei 1600 U/min zentrifugiert, um eine ausreichend konzentrierte Zellsuspension zu erzeugen.

3.1.4 Bestimmung der Zellzahl

Für die Bestimmung der Zellzahl wurden mit einer Eppendorfpipette 2 µl Zellsuspension aus dem Pellet entnommen, mit PBS verdünnt und mit 10%iger Trypanblau-Lösung (Sigma) versetzt. Der Vitalfarbstoff Trypanblau permeiert die Zellmembran nur bei gestörter Membranintegrität und kann zur Bestimmung der Anzahl lebender Zellen eingesetzt werden. Ausgezählt wurden die Zellen über der Fläche der 4 Eckquadrate (1 mm²) einer Neubauer Zählkammer. Diese besteht aus 16 Kleinquadraten mit einer Seitenlänge von 0,25mm und hat eine Höhe von 0,1mm. Somit beträgt das Volumen über einem Eckquadrat 0,1mm³ bzw. 0,1µl. Zur Berechnung der Zellzahl wurde die folgende Formel herangezogen:

$$N_V [\text{ml}] = N_{\text{EQ}} \times 10^4 \times VF \times V$$

N_V	: Gesamtzellzahl/Volumen der Zellsuspension
N_{EQ}	: Mittelwert der Zellzahl/Eckquadrat
VF	: Verdünnungsfaktor
V	: Volumen der Zellsuspension in ml

Die Zellzählung wurde unter einem inversen Lichtmikroskop (Leica DMIL, Solms, Deutschland) bei 100facher Gesamtvergrößerung durchgeführt. Die Lebendzellzahl errechnet sich aus dem prozentualen Anteil der vitalen Zellen an der Gesamtzellzahl. Es wurden insgesamt 10 Zählungen durchgeführt und so die zu implantierende Zellzahl auf 1×10^5 festgelegt.

3.1.5 Analyse mittels Durchflusszytometrie

Die durchflusszytometrische Analyse (FACScan, Becton Dickinson, Mountain View, CA, USA) diente dem Nachweis der Expression der Chemokin-Rezeptors CXCR4 und CXCR7 auf den CT26.WT und CT26.WT-GFP-Zellen. Nach Trypsinierung wurden die Zellen in 1 ml Cytofix/Cytoperm (BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland) 20 min bei 4°C fixiert, zweimal mit Perm Wash (BD, Biosciences) gewaschen und bei Raumtemperatur 40 min lang entweder mit einem polyklonalen Ziegen-anti-Maus-CXCR4-Antikörper (Santa Cruz, Heidelberg, Deutschland) oder einem Maus-IgG2b-anti-CXCR7-Antikörper (BioLegends, San Diego, USA) inkubiert. Zur Fluoreszenzmarkierung wurde ein Cy3-konjugierter-Antikörper (1:25; Dianova) verwendet. Die Zellen wurden nochmals gewaschen, um überschüssige Antikörper zu entfernen und anschließend in PBS, versetzt mit 1% Paraformaldehyd aufbewahrt. Die Durchflusszytometrie erfolgte innerhalb der nächsten 3 Stunden. Zur exakten Einstellung des Messinstruments wurde das Durchflusszytometer mit fluoreszierenden Standard-Microbeads kalibriert (CaliBRITE Beads, BD Biosciences). Die Tumorzellen wurden auf ihre Fluoreszenz-Eigenschaften, bei festgelegten 5000 Ereignissen pro Probe, mit Hilfe des CellQuest Data Handling-Programms (BD Biosciences) untersucht.

3.1.6 *In vitro*-Experimente mittels Chemotaxiskammern

Die Migrationsfähigkeit der CT26.WT-Zellen wurde in 24-Well-Chemotaxis Kammern mit Polyvinylpyrrolidon-beschichteten Polykarbonatfiltern von 8 µm Porengröße (BD Falcon, Heidelberg, Deutschland) untersucht. Die Untersuchungen zur Chemotaxis erfolgten dreifach. Das Chemokin SDF-1 (rekombinantes Maus-SDF-1α/CXCL12, Nr. 460-SD; R&D Systems, Wiesbaden, Deutschland) wurde in PBS und 0,1% BSA (bovines Serumalbumin, Sigma) gelöst und in aufsteigender Konzentration von 0,1 nM, 1 nM, 10 nM, 100 nM, 200 nM und 400 nM in 700 µl RPMI-1640 Medium in die unteren Wells gegeben. PBS, versetzt mit 0,1% BSA, diente als Kontrollmedium. 500 µl einer Zellsuspension mit 1×10^5 Zellen in RPMI-1640 wurden den oberen Wells zugesetzt und die Kammer anschließend 24h lang bei 37°C in humider Atmosphäre mit 5% CO₂ inkubiert. Nach der Inkubation wurden die nicht-migrierten Zellen von der Oberfläche des Filters entfernt, während die migrierten Zellen, welche an der Unterfläche des Filters adhären waren, mit Methanol fixiert und mit Dade Diff-Quick (Dade Diagnostika GmbH, München, Deutschland) markiert wurden. Die Anzahl dieser adhären Zellen wurde lichtmikroskopisch in 10 High-Power-Fields (HPF) ausgezählt. Zusätzlich wurden die nicht-adhären Zellen, die in das unterer Well migriert waren, gesammelt und deren Zahl durchflusszytometrisch ermittelt. Die Zahl der adhären Zellen wurde als Anzahl der Zellen pro 10 HPFs, die der migrierten Zellen als Anzahl der Zellen pro Well angegeben.

3.2 Tierexperimentelles Modell

3.2.1 Tierkollektiv und Versuchstierhaltung

Alle Tierexperimente wurden vom Veterinäramt des Saar-Pfalz-Kreises genehmigt und unter Einhaltung der Vorschriften des Tierschutzgesetzes durchgeführt. Es wurden 12-16 Wochen alte, weibliche BALB/c Mäuse (Charles River Laboratories GmbH, Sulzfeld, Deutschland) mit einem Körpergewicht von 18-22g verwendet, die in Einzelkäfigen bei Raumtemperaturen von 22-24°C und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 60 -65%, mit einem 12 Stunden Tag/Nacht Rhythmus untergebracht waren. Die Tiere hatten freien Zugang zu Trinkwasser und Standard-Labornahrung (Altromin 1324, Altromin GmbH, Lage, Deutschland) und konnten sich in den Käfigen frei bewegen. Das Schlaf- und Fressverhalten und der Allgemeinzustand der Tiere wurden täglich kontrolliert.

3.2.2 Rückenhautkammer-Modell

Das Rückenhautkammer-Modell der Maus, in Kombination mit der Intravital-Fluoreszenzmikroskopie, ist ein etabliertes Verfahren zur repetitiven Untersuchung der Mikrozirkulation, bei vergleichsweise geringer Invasivität (Vajkoczy P et al., 1998; Vajkoczy P et al., 2000; Menger MD et al., 2002). In Kombination mit der GFP-Transfektion von Tumorzellen ist die Beurteilung der Frühphase der Tumorentstehung, einschließlich Tumorzellmigration und Angiogenese, möglich. Aufgrund der Eigenfluoreszenz der Tumorzellen kann die Entwicklung der Mikrozirkulation auch ohne wiederholte Applikation von Fluoreszenzmarkern untersucht werden (Li CY et al., 2000; Jain RK et al., 2002; Sturm JW et al., 2003; Steinbauer M et al., 2003).

Für die Narkose der Versuchstiere wurde zunächst eine Lösung, bestehend aus 10 Vol. % Xylazinhydrochlorid (Rompun® 2%, Bayer, Leverkusen, Deutschland) und 7,5 Vol. % Ketaminhydrochlorid (Ketavet®, Ketamin 100mg/ml, Pharmacia GmbH, Erlangen, Deutschland) in 0,9%iger Kochsalzlösung hergestellt. Anschließend wurden die Tiere gewogen und gewichtsadaptiert mit einer intraperitonealen Injektion von je 10 ml/kg KG (= 90 mg/kg KG Ketamin + 20 mg/kg KG Xylazin) Narkotikum betäubt. Auf diese Weise wurde für die Dauer von etwa 30-40 min eine tiefe Narkose induziert. Bei Bedarf konnten weitere Injektionen zur Aufrechterhaltung der Anästhesie vorgenommen werden. Danach wurde der Rücken der Tiere mit einem Tierhaarschneider rasiert und dann mit Hilfe einer Enthaarungscreme (Pilca med®, Asid Bonz GmbH, Böblingen, Deutschland) vollständig enthaart. Rückstände wurden unter lauwarmem, fließendem Wasser entfernt, um Hautirritationen zu vermeiden.

Insgesamt wurden bei 39 Versuchstieren Rückenhautkammern implantiert. Die verwendeten Kammern bestehen aus 2 symmetrischen Titan-Halbrahmen. Der später rückwärtig

angebrachte Rahmen wurde vor Beginn der Präparation mit 3 Halteschrauben versehen, welche mit Muttern fest fixiert wurden. Zusammen mit dem benötigten Instrumentarium wurden die vorbereiteten Kammern 15 min bei 80°C im Ultraschallbad gereinigt. Für die Präparation wurde unter Gegenlichtkontrolle zunächst die Rückenhautfalte der Maus in der Medianlinie angehoben. Die durchscheinenden Gefäße der so entstandenen Hautduplikatur wurden zur Deckung gebracht und danach die Hautfalte mit je einem kranialen und kaudalen Haltefaden an einer Querstange fixiert. Die rückwärtige Hälfte der Rückenhautkammer wurde kranial des Insertionsgebietes des M.retractor und kaudal der, entlang der Schulterbasis verlaufenden Versorgungsgefäße angebracht. Hierzu wurde zunächst die Rückenhaut mit Haltenähten in den dafür vorgesehenen Ösen am Titanrahmen befestigt. Die beiden Halteschrauben wurden mit 2 Stichinzisionen durch die Hautfalte hindurchgeführt und mit Klemmen fixiert. Anschließend wurde der, im Durchlicht sichtbare Bereich des späteren Beobachtungsfensters markiert und die Maus zur Präparation in Rechtsseitenlage unter dem Operationsmikroskop positioniert. Unter 4facher Vergrößerung wurden danach innerhalb des gekennzeichneten Areals Haut, Hautmuskulatur, Faszien-Fettgewebe und die beiden Schichten des M.retractor mit einer Mikroschere entfernt und so die gegenüberliegende, quergestreifte Hautmuskulatur freigelegt. Um eine ausreichende Befeuchtung des OP-Feldes zu gewährleisten und um kleine Blutungen zu stillen, erfolgten während und nach der Präparation gründliche Spülungen mit 0,9%iger NaCl-Lösung. Anschließend wurde der zweite Titanrahmen aufgesetzt, die Klemmen von den Halteschrauben entfernt und der Rahmen mit 3 Muttern fixiert. Zuletzt wurde das Deckglas auf das Beobachtungsfenster aufgelegt und mit einem Spannring fixiert, sobald das Gewebe ohne Lufteinschlüsse am Glas adhärierte. Nach Ende des Eingriffs wurden die Tiere bis zum Wiedererwachen in ihren Käfigen vor eine Rotlicht-Wärmelampe gestellt, um die Wiederherstellung der Normothermie zu unterstützen.

Es folgte eine 48 Stunden dauernde Erholungsphase, in der die Tiere normal ernährt wurden und ihren gewohnten Schlaf-Wach-Rhythmus einhalten konnten.

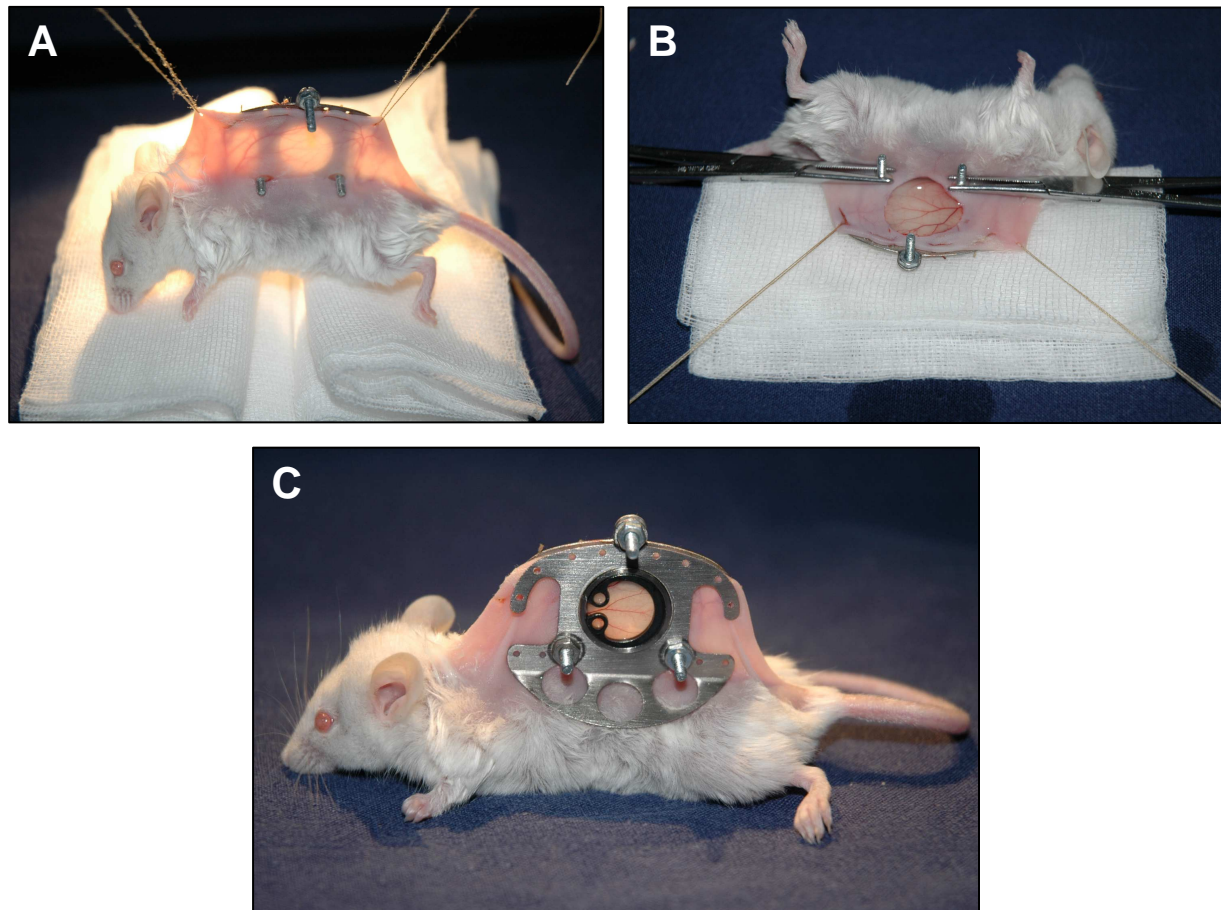


Abbildung 1: Präparation der Rückenhautkammer

Arbeitsschritte bei der Präparation der Rückenhautkammer bei der BALB/c-Maus: (A) Im Durchlicht sichtbarer Bereich des späteren Beobachtungsfensters nach Anhebung der Rückenhautfalte und Fixierung des rückwärtigen Teils des Titan-Halbrahmens. (B) Ansicht nach Präparation des Beobachtungsfensters unter dem Operationsmikroskop, unmittelbar vor dem Aufsetzen des zweiten Titan-Halbrahmens. (C) Fertige Rückenhautkammer

3.2.3 Leberresektion

Bei insgesamt 23 Versuchstieren wurde unmittelbar vor Implantation der Tumorzellen in die Rückenhautkammer eine 30%ige Leberresektion (Phx) durchgeführt. Der Eingriff erfolgte 48 Stunden nach Implantation der Rückenhautkammer. Nach Narkose und Rasur des Abdomens wurde eine mediane Oberbauchlaparotomie vorgenommen und der linke Leberlappen mobilisiert. Anschließend wurden die, den Leberlappen versorgenden und drainierenden Blutgefäße am Hilus mit einem resorbierbaren, geflochtenen Faden (Vicryl® 5-0, Ethicon, Norderstedt, Deutschland) ligiert und das Lebergewebe mit einer Mikroschere hilusnah reseziert. Nach Spülung des Abdomens und Kontrolle der Hämostase erfolgte der allschichtige, fortlaufende Verschluss der Laparotomie mit nicht-resorbierbarem Nahtmaterial (Prolene® 4-0, Ethicon, Norderstedt). Die Masse des so entfernten linken Leberlappens betrug im Mittel $0,27\text{g} \pm 0,03\text{g}$.

3.2.4 Tumorzell-Implantation

Für die Tumorzell-Implantation wurden die CT26.WT-GFP-Zellen zunächst, wie unter 3.1.3 beschrieben, aufbereitet. Dies erfolgte zeitnah, um ihre Teilungsfähigkeit sicherzustellen. Mit Hilfe einer Eppendorfpipette wurde der Zellsuspension ein Volumen von 2 µl, entsprechend einer Zellzahl von 1×10^5 , entnommen. Nach Entfernen des Spannrings und Abheben des Deckglases im Sichtfenster der Rückenhautkammer, wurden die Zellen in das obere Kammerdrittel implantiert. Die Platzierung der Tumorzellen richtete sich nach dem Verlauf der Versorgungsgefäße im Beobachtungsfenster. Angestrebt wurde die exakte Implantation zwischen den großen Gefäßstämmen. Nach der Implantation wurde ein neues Deckglas aufgelegt und mit einem Spannring fixiert, wobei wiederum auf eine blasenfreie Adaptation des Gewebes geachtet wurde. Überschüssige CT26.WT-GFP Zellen wurden verworfen. Im Anschluss wurden die Tumoren hinsichtlich ihrer Primärausdehnung intravitalmikroskopisch untersucht. Um eine stabile Etablierung der Tumoren zu sichern und eine artifizielle Zellverschleppung zu verhindern, wurde eine Ruhephase von 4 Tagen bis zur nächsten Intravitalmikroskopie eingehalten.

3.3 Intravital-Fluoreszenz-Mikroskopie

3.3.1 Technik

Die Video- und Computergestützte Intravital-Fluoreszenz-Mikroskopie ist eine seit vielen Jahren etablierte Methode zur Untersuchung von physiologischen und pathologischen Vorgängen *in vivo*, wie z.B. Wundheilung, Ischämie-/Reperfusionsreaktionen oder Tumorentwicklung (Vajkoczy P et al., 2000; Menger MD et al., 2003).

Für die Mikroskopie wurde ein modifiziertes Zeiss Axio-Tech-Mikroskop (Zeiss, Oberkochen Deutschland) mit einer 100 Watt HBO-Quecksilberdampf Lampe verwendet. Die Helligkeit der Lampe lässt sich über ein FluoArc-Steuersystem (Carl Zeiss, Jena, Deutschland) regulieren. Die Aufnahmen wurden in Auflicht-Technik mit einem, in einen Rasterschieber integrierten Blaulichtfilter (450-490 nm Exzitations- und >520 nm Emissionswellenlänge) durchgeführt. Mit einer angeschlossenen Videokamera (FK 6990, COHU, Prospective Measurements Inc., San Diego, CA, USA), wurden die Bilder in ein Videosystem überspielt (VO-5800 PS, Sony, München, Deutschland) und auf Super-VHS-Kassetten (Fuji Magnetics GmbH, Kleve, Deutschland) für die Offline-Analyse aufgezeichnet.

Es wurden folgende Objektive verwendet:

- 4x: UPlanFI, Olympus, Japan, n.A. 0,13
- 10x: Plan Neofluar, Carl Zeiss, Jena, Deutschland, n.A. 0,30
- 20x / Wasserimmersion: Achroplan, Carl Zeiss, Jena, Deutschland, n.A. 0,50

3.3.2 Mikroskopie

Zu jeder Intravitalmikroskopie wurden die Versuchstiere jeweils, wie oben beschrieben, narkotisiert und anschließend mit einem Faden auf einer Plexiglasplatte fixiert. Dabei dienten die Schrauben, mit denen die Titankammer an der Rückenhaut befestigt ist, als Widerlager. Auf diese Weise wurde ein Verrutschen der Kammer während der Mikroskopie verhindert. Die Plexiglasplatte wurde anschließend auf den Objektträger des Intravitalmikroskops aufgelegt und das Beobachtungsfenster der Rückenhautkammer unter dem Objektiv positioniert.

Die erste Intravitalmikroskopie erfolgte unmittelbar nach Implantation der Tumorzellen unter Verwendung der 4x und 10x Objektive. Sie diente der Beurteilung der Ausgangsgröße des Tumors, der Zellmorphologie und der Dokumentation möglicher artifizieller Zellverschleppung durch die Implantationstechnik. Weitere Intravitalmikroskopien erfolgten an den Tagen 5, 7, 9, 12 und 14 nach Tumorzell-Implantation und umfassten Übersichtsaufnahmen mit dem 4x Objektiv sowie die, in Abb.2 und 3 aufgeführten Beobachtungsareale. Im Anschluss an die letzte Intravitalmikroskopie wurden die Tiere mit einer Überdosis Pentobarbital-Natrium (Narcoren®, Merial GmbH, Hallbergmoos, Deutschland) getötet. Der Tumor tragende Anteil der Rückenhaut wurde zur histologischen Aufarbeitung entnommen und konserviert.

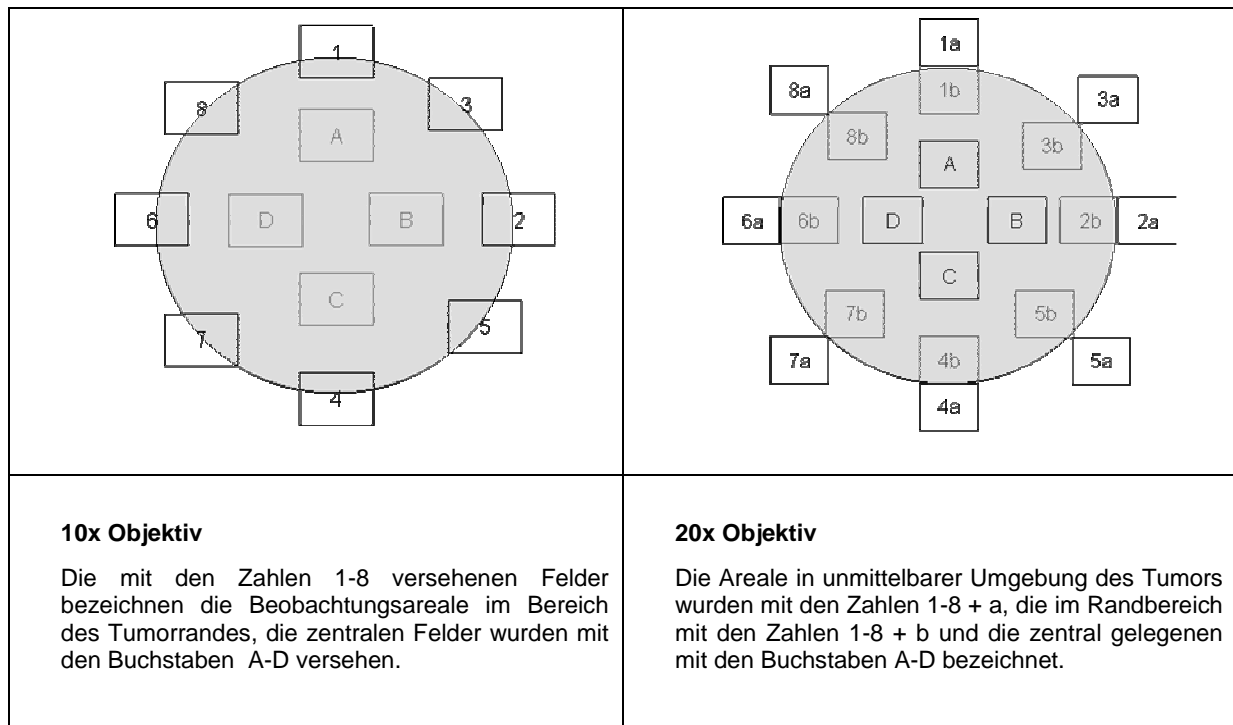


Abbildung 2: Anordnung der Beobachtungsareale

3.3.3 Computergestützte Auswertung

Die Bildschirmauswertung der auf VHS aufgezeichneten intravitalmikroskopischen Aufnahmen erfolgte offline mit Hilfe einer speziell hierfür entwickelten Bildanalyse-Software (CAPIMAGE, Zeintl Software Engineering, Heidelberg, Deutschland). Das Programm erlaubt jedem Benutzer, die auf seine Experimente abgestimmten Auswertungsparameter zu definieren und unter seinem Benutzernamen zu speichern. Somit wurden zu jedem Zeitpunkt der Auswertung standardisierte Bedingungen garantiert.

Als Parameter zur Quantifizierung des Tumorwachstums wurde die Tumorfläche [mm^2] durch Umrandung des entsprechenden Areals ausgemessen und zusätzlich der horizontale, vertikale und zwei diagonale Durchmesser [μm] bestimmt.

Zur Untersuchung der Tumorzellmigration wurde zunächst in den Feldern 1-8 (Abb.2) die jeweils am weitesten vom Tumorrand entfernte CT26.WT-Zelle ermittelt und deren Abstand vom Tumorrand gemessen [μm]. Des weiteren wurden unter höherer Vergrößerung in den Feldern 1a-8a (Abb.4) mit Hilfe einer Schablone diejenigen Zellen ausgezählt, welche sich innerhalb eines definierten, repräsentativen, $0,05\text{mm}^2$ großen Areals in unmittelbarer Umgebung des Tumors befanden. Zusätzlich wurde die Zellmorphologie beurteilt. Unmittelbar nach Trypsinierung und Implantation in die Rückenhautkammer sind die Zellen typischerweise rund. Zum Zeitpunkt der 2. Intravitalmikroskopie, also am Tag 5 nach Implantation, zeigen die meisten Zellen jedoch Pseudopodien-ähnliche Ausziehungen des Zytoplasmas, die ihnen ein spindelförmiges Aussehen verleihen. Der Anteil dieser Zellen wurde semiquantitativ als Anzahl pro 4 Tumorzellen [$n/4$] angegeben.

Um die Entwicklung der Mikrozirkulation der Tumoren zu beurteilen, wurden die mittleren Durchmesser der neu gebildeten Tumorgefäße im Tumorrandbereich (Felder 1b-8b), sowie im Tumorzentrum (Felder A-D, 20x Objektiv) ermittelt. Hierzu wurden in jedem der genannten Felder die Durchmesser [μm] von jeweils 5 Kapillaren unterschiedlichen Kalibers ausgewählt, die in ihrer Gesamtheit repräsentativ für den entsprechenden Bildausschnitt waren. Die Messung erfolgte senkrecht zum Gefäßverlauf. Die Kapillardichte [cm/cm^2] errechnete sich aus der Gesamtlänge der perfundierten Gefäßabschnitte pro Feld. Petechiale Einblutungen als Zeichen gesteigerter Kapillarpermeabilität während der Neoangiogenese imponierten im jeweiligen Beobachtungsfeld als dunklere Areale und wurden mit 1 (= vorhanden) bzw. 0 (= nicht vorhanden) quantifiziert.

3.4 Tierexperimentelles Protokoll

Gruppe	Leberresektion	SDF-1 Applikation	Antikörpertherapie
KON-1	keine	keine	keine
SDF-1	keine	lokal an Tag 5 nach Zellimplantation	keine
KON-2	30%	keine	Kontroll-IgG
MAB-5	30%	keine	Anti-SDF-1 Tag 5, 7, 9, 11 und 13 nach Zellimplantation
MAB-0	30%	keine	Anti-SDF-1 Tag 0, 2, 4, 6, 8, 10 und 12 nach Zellimplantation

Tabelle 1: Versuchsgruppen in der Übersicht

3.4.1 KON-1

Diese Tiere dienten als neutrales Kontrollkollektiv (n=8). 48 Stunden nach Präparation der Rückenhautkammer, wurden den BALB/c-Mäusen 1×10^5 CT26.WT-GPF-Tumorzellen, wie unter 3.2.4 beschrieben, in die Kammer implantiert. Nach einer Ruhephase von 4 Tagen wurden 10 µl des Trägermediums der Chemokinlösung (PBS + 0,1% BSA), mit einer Eppendorfpipette in die Kammer getropft. Die intravitalmikroskopischen Untersuchungen folgten dem oben genannten Protokoll.

3.4.2 SDF-1

Diese Versuchsgruppe (n=8) diente der Untersuchung der lokalen Wirkung von exogen zugeführtem SDF-1 auf das Tumorstadium. Am Tag 5 nach Tumorzell-Implantation wurden mit einer Eppendorfpipette 10 µl einer 100 nM SDF-1-Lösung in die Rückenhautkammer eingetropft. Das Versuchsprotokoll erfolgte analog zur Kontrollgruppe KON-1. Verwendet wurde ein rekombinantes Maus-SDF-1 α (460-SD, R&D Systems), das gemäß der Anweisung des Herstellers in einem Trägermedium aus PBS + 0,1% BSA gelöst wurde. Diese Lösung wurde bis zur Verwendung in Aliquots zu je 100 µl in Eppendorfhütchen bei -20°C gelagert und bei Bedarf aufgetaut.

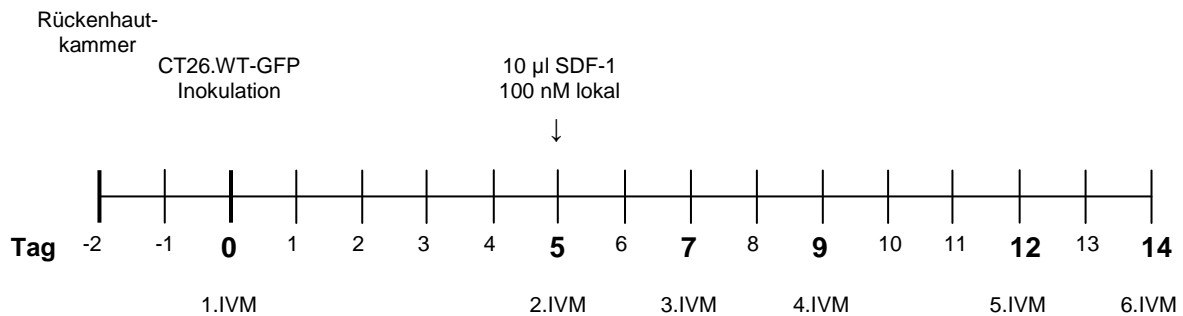


Abbildung 3: Versuchsablauf zu SDF-1 im Zeitstrahl

3.4.3 KON-2

In dieser Gruppe (n=8) wurde unmittelbar vor Implantation der Tumorzellen eine 30%ige Phx durchgeführt, wie unter Punkt 3.2.3 beschrieben. Die Tiere erhielten an den Tagen 0, 2, 4, 6, 8, 10 und 12 nach Zell-Inokulation intraperitoneale Injektionen mit einem monoklonalen Anti-Maus-IgG₁-Kontroll-Antikörper (MAB002, R&D) in einer Konzentration von 1mg/kg KG.

3.4.4 MAB-5

Die Tiere dieser Versuchsgruppe (n=7) erhielten an den Tagen 5, 7, 9, 11 und 13 nach 30% Phx und Tumorzell-Implantation intraperitoneale Injektionen mit einem murinen monoklonalen Anti-Maus-SDF-1-Antikörper (MAB310, R&D Systems) in einer Konzentration von jeweils 1mg/kg KG. Bis zum Ende des Beobachtungszeitraums wurde den Tieren so eine Gesamtdosis von 5mg/kg KG Anti-SDF-1 verabreicht.

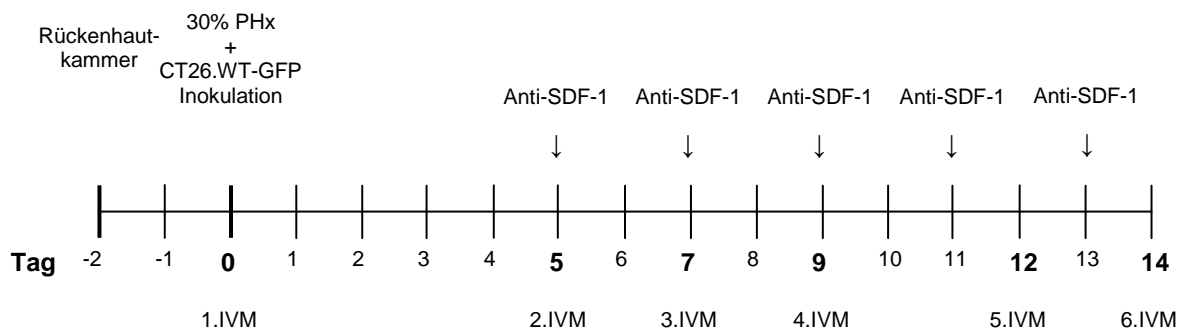


Abbildung 4: Versuchsablauf MAB-5 im Zeitstrahl

3.4.5 MAB-0

Im Unterschied zu Gruppe MAB-5, wurde in der Gruppe MAB-0 (n=8) bereits am Tag der Tumorumplantation mit der Antikörper-Injektion begonnen. Diese wurde dann im Abstand von jeweils 2 Tagen bis einschließlich Tag 12 wiederholt, sodass jedes Tier bis zum

Versuchende eine Gesamtdosis von 7 mg/kg KG Anti-SDF-1 erhielt. Der übrige Versuchsablauf erfolgte analog.



Abbildung 5: Versuchsablauf MAB-0 im Zeitstrahl

3.5 Histologie und Immunhistochemie

3.5.1 Probenentnahme und Konservierung

Im Anschluss an die letzte Intravitalmikroskopie wurde der Tumor tragende Gewebeanteil mit einem Abstand für die histologische Aufarbeitung reseziert und mit Nadeln auf einer dünnen Korkplatte aufgespannt. Anschließend wurde das Resektat mit einem Skalpell halbiert. Eine Hälfte wurde in 4%iger Formaldehydlösung (Roti-Histofix 4%, Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland) konserviert, die andere wurde in Tissue Freezing Medium eingebettet, (Jung; Leica Microsystems Nussloch GmbH, Nussloch, Deutschland) in Flüssigstickstoff eingefroren und bei -80°C aufbewahrt.

Die in Formaldehyd fixierten Gewebeproben wurden entwässert und in Paraffin eingebettet. Von den erstarrten Paraffinblöcken wurden Präparate von 5 µm Schnittdicke angefertigt. Als Standardfärbung diente die Hämatoxylin-Eosin (HE)-Färbung nach Mayer. Anhand der HE-Schnitte wurde das Wachstumsmuster der Tumoren analysiert. Die Tumorzellinvasion durch die Muskelschicht wurde vermessen und als prozentualer Anteil an der Gesamtlänge der Tumorbasis angegeben.

Als Proliferationsmarker wurde PCNA (Proliferating cell nuclear antigen), als Apoptosemarker gesplante Caspase-3 immunhistochemisch dargestellt. Nach Entparaffinierung wurden PCNA und gesplante Caspase-3 mittels indirekter Immunoperoxidase-Technik gefärbt. Zur Blockierung von endogenen Peroxidasen sowie uncharakteristischen Bindungsstellen wurden die Schnitte zuerst mit 3%igem H₂O₂ und 2%igem normalem Ziegenserum inkubiert. Als Primärantikörper gegen PCNA wurde ein monoklonaler Maus-Anti-Pan-PCNA-Antikörper (PC10; 1:50; DakoCytomation, Hamburg,

Deutschland), gegen gespaltene Caspase-3 ein polyklonaler Kaninchen-Anti-Maus-Caspase-3-Antikörper (ASP175, 1:50; Cell Signaling Technology, Frankfurt, Deutschland) verwendet. Letzterer detektiert nur das kurze Fragment (17/19 kD) der gespaltenen und dadurch aktivierten Caspase-3 und nicht das intakte Molekül. Biotinylierte Ziegen-Anti-Maus- und Ziegen-Anti-Kaninchen-Immunglobulin-Antikörper (1:200; LSAB 2 System HPR, DakoCytomation) wurden als Sekundärantikörper für die Peroxidasereaktion verwendet. 3,3'-Diaminobenzidin (DakoCytomation) diente als Chromogen. Die Schnitte wurden nach Mayer mit Hämalun gegengefärbt und lichtmikroskopisch untersucht.

Für die Immunhistochemische Darstellung des CXCR4-Rezeptors wurden aus den, in Tissue Freezing Medium (Jung) bei -80°C kryokonservierten Gewebeproben, zunächst 5µm dicke Kryostatschnitte angefertigt. Diese wurden erst 5 s lang in 4°C kaltem Azeton, dann 10 min in 4%igem Formaldehyd fixiert und mit 2%igem normalem Eselserum geblockt. Die Gewebeschnitte wurden anschließend mit einem polyklonalen Ziegen-Anti-Maus-CXCR4-Antikörper (1:10; Santa Cruz, Heidelberg, Deutschland) inkubiert. Als Sekundärantikörper diente ein HRP-konjugierter Esel-Anti-Ziegen-IgG-Antikörper (1:500; Amersham, Freiburg). Als Chromogen wurde 3,3'-Diaminobenzidin verwendet, die Gegenfärbung erfolgte nach Mayer mit Hämalun.

Als Negativkontrollen wurden zusätzliche Schnitte jeder Probe mit einem entsprechenden isotypen-spezifischen Kontroll-Antikörper (Sigma Aldrich Chemie GmbH) anstelle des Primärantikörpers, gemäß des beschriebenen Protokolls behandelt, um die Spezifität der Antikörper-Bindung nachzuweisen. Sämtliche Kontrollen fielen negativ aus.

Die semiquantitative Auswertung der histologischen Schnitte erfolgte lichtmikroskopisch in Auflichttechnik. Tumormorphologie und Infiltrationstiefe wurden anhand der HE-Färbungen untersucht. Bei den immunhistologischen Schnitten wurde unter 175facher Vergrößerung die Anzahl der positiven und negativen Zellen pro High-Power-Field (HPF) ermittelt. Es wurden jeweils 5 periphere und 5 zentrale HPFs ausgezählt.

3.6 Western Blot-Analyse

Zur Proteinextraktion für den Nachweis von gespalteener Caspase-3, PCNA, VEGF und CXCR4 mittels Western Blot wurden CT26.WT-GFP-Tumoren an den Tagen 5 und 9 nach Implantation aus der Rückenhautkammer entnommen (jeweils n=3). Die Tiere hatten eine 30%ige Phx sowie Injektionen mit Anti-SDF-1 oder mit dem entsprechenden Kontroll-Antikörper gemäß des Versuchsprotokolls der Gruppen MAB-0 und KON-2 erhalten. Die Tumoren in der Rückenhautkammer wurden mit einem sterilen Metallspatel, ohne Mitnahme von umgebendem Wirtsgewebe abgetragen, sofort in eisgekühltem Lysis-Puffer (10 mM Tris pH 7,5; 10 mM NaCl; 0,1 mM EDTA; 0,5% Triton-X100; 0,02 mM NaN₃; 0,2 mM PMSF und

Protease-Inhibitor-Cocktail 1:100 v/v; Sigma, Taufkirchen, Deutschland) in Flüssigstickstoff eingefroren und bei -80°C bis zur Weiterverarbeitung aufbewahrt. CT26.WT-GFP-Zellen aus sub-konfluierenden Kulturen dienten als *in vitro*-Kontrolle.

Für die Proteinextraktion wurden Tumorgewebe bzw. Tumorzellen zunächst in Lysis-Puffer (Sigma) homogenisiert, 30 min auf Eis inkubiert und anschließend 30 min lang mit 16 000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde als Gesamtprotein-Extrakt asserviert. Die Proteinkonzentration wurde mittels Lowry-Assay mit Hilfe von bovinem Serumalbumin als Standard bestimmt. 30 µg Protein pro Säule wurden mittels Elektrophorese diskontinuierlich auf SDS-Polyacrylgel (10% SDS-PAGE) aufgetrennt und auf eine Polyvinylidendifluoridmembran (0,2 µm, BioRad, München, Deutschland) transferiert. Nach Saturierung unspezifischer Bindungsstellen durch 30 min Inkubation mit 5%iger Milchpulverlösung (Blotting Grade Blocker non-fat dry milk, BioRad) in TBS-T-Puffer (1,5 mM TRIS Base, pH 7,5; 1% NaCl; 0,01% Tween 20 (Roth) in Aqua dest.) erfolgte die Inkubation mit dem jeweiligen Primärantikörper bei Raumtemperatur (RT) für jeweils 120 min (Tab.2).

Als Sekundärantikörper dienten entsprechende Peroxidase-gekoppelte Antikörper (90 min, 1:5000, Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland und R&D Systems, Wiesbaden, Deutschland). Die Proteinextrakte wurden mittels luminolverstärkter Chemolumineszenz (ECL, Amersham) und Exposition der Membranen gegenüber einem Blaulicht-sensitiven Autoradiographie-Film (Hyperfilm ECL, Amersham) visualisiert. Die Signalstärke wurde densitometrisch analysiert (BioRad, Gel-Dokumentationssystem). Zur Kontrolle der Proteinbeladung und des Proteintransfers wurden die ermittelten Daten über einen β-Aktin-Standard korrigiert. Zur Detektion von β-Aktin wurde ein monoklonaler Maus-Anti-β-Aktin-Antikörper (AC-15; 1:5000; Sigma) verwendet.

Antigen	Charakteristik des Antigens	Primär-Antikörper/ Klonbezeichnung	Hersteller	Verdünnung/ Inkubationszeit
gespaltene Caspase- 3	Exekutionsprotease der Apoptose	Polyklonaler Kaninchen-Anti- gespaltene- Caspase-3-AK	Cell Signaling Technology, Frankfurt, Deutschland	1:800 120 min bei RT
PCNA	Co-Faktor der DNA- Polymerase- δ in der S- Phase, assoziiert mit Zellproliferation und DNA-,Repair'	Monoklonaler Maus- Anti- PCNA-AK	Dako Cytomation, Hamburg, Deutschland	1:2000 120 min bei RT
VEGF	bedeutender pro- angiogener Faktor	Polyklonaler Kaninchen-Anti- Maus-VEGF- AK	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Deutschland	1:100 120 min bei RT
CXCR4	G-Protein-gekoppelter Rezeptor des Chemo- kins SDF-1/CXCL12	Polyklonaler Ziegen- Anti-Maus-CXCR4- AK	Santa Cruz, Biotechnology, Heidelberg, Deutschland	1:200 120 min bei RT

Tabelle 2: Verwendete Antikörper für die Western Blot-Analysen

3.7 Statistik

Alle statistischen Analysen wurden mit Hilfe des Software Pakets SigmaStat (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) vorgenommen. Die Werte wurden als Mittelwert \pm SEM angegeben. Nach der Prüfung auf Normalverteilung und Homogenität der Varianz in den verschiedenen Versuchsgruppen, wurden zunächst Unterschiede zwischen den Gruppen mittels Varianzanalyse (ANOVA) kalkuliert und anschließend ein entsprechender Post-Hoc-Test durchgeführt. Statistische Signifikanz wurde bei $p < 0,05$ angenommen.

4. Ergebnisse

4.1 CXCR4 / CXCR7-Expression auf CT26.WT-Zellen und Zellproliferation *in vitro*

Die Durchflusszytometrie zeigte, dass ~30% der CT26.WT-Zellen positiv für CXCR4 (Abb.6A) und ~65% positiv für CXCR7 waren (Abb.6B). Nach der Transfektion mit dem enhanced-GFP-Expressionsvektor pEGFP-N1 fand sich eine äquivalente Expression von CXCR4 ($32,21 \pm 4,30\%$, Abb.1B). Die Wachstumseigenschaften beider Zell-Linien in der Zellkultur waren während der 7-tägigen Beobachtungszeit ebenfalls äquivalent (Abb.1C). Interessanterweise zeigten die CT26.WT-GFP-Zellen zwischen dem ersten und zweiten Tag eine signifikant kürzere minimale Verdopplungszeit im Vergleich zu den nicht-transfizierten CT.26-WT-Zellen ($10,68 \pm 0,75\text{h}$ vs. $14,94 \pm 0,77\text{h}$; $p < 0,05$).

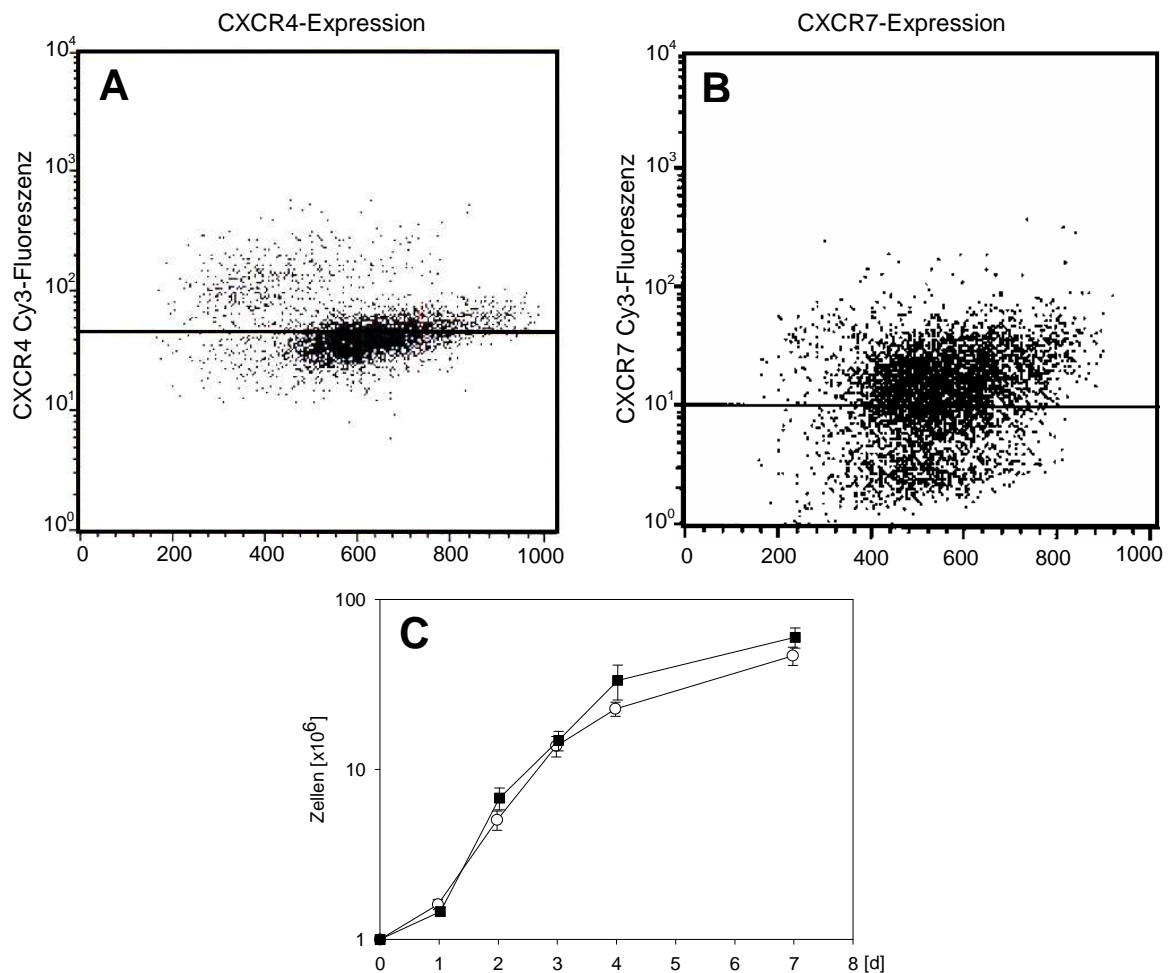


Abbildung 6: Durchflusszytometrie und Wachstumskurven

Die FACS-Analyse der CT26.WT-Zellen zeigte eine Expression der Chemokin-Rezeptoren CXCR4 und CXCR7 von ~30% für CXCR4 (A) und ~65% für CXCR7 (B). *In vitro* zeigten die CT26.WT und CT26.WT-GFP-Zell-Linien ein äquivalentes Wachstumsverhalten während der 7tägigen Beobachtungsperiode (C).

4.2 SDF-1-vermittelte Tumorzellmigration *in vitro*

Die Adhäsions- und Migrationsassays in der Chemotaxiskammer zeigten, dass nur wenige Zellen unter Kontrollbedingungen, d.h. unter PBS-Stimulation, adhärten und migrierten (Abb.7). In einer Konzentration von 0,1 nM induzierte SDF-1 eine 3,4fach höhere Adhäsion an den Polykarbonat-Filtern. Bei einer Konzentration von 1 nM SDF-1 kam es zu einer weiteren Verstärkung der Adhäsion, welche im Vergleich zur Kontrolle 4,3fach erhöht war (Abb.7A). Bei weiterer Steigerung der SDF-1 Konzentration war die Chemokin-induzierte Adhäsion deutlich abgeschwächt. Die Analyse der Anzahl der durch den Filter ins tiefere Well migrierten Zellen, zeigte einen 2 bis 6fachen Anstieg nach Low-Dose-Stimulation mit SDF-1 (0,1-100 nM), während höhere Dosen (200-400 nM) im Vergleich zur PBS-Kontrolle zu einem exponentiellen Anstieg (16 bis 17fach) führten (Abb.7B).

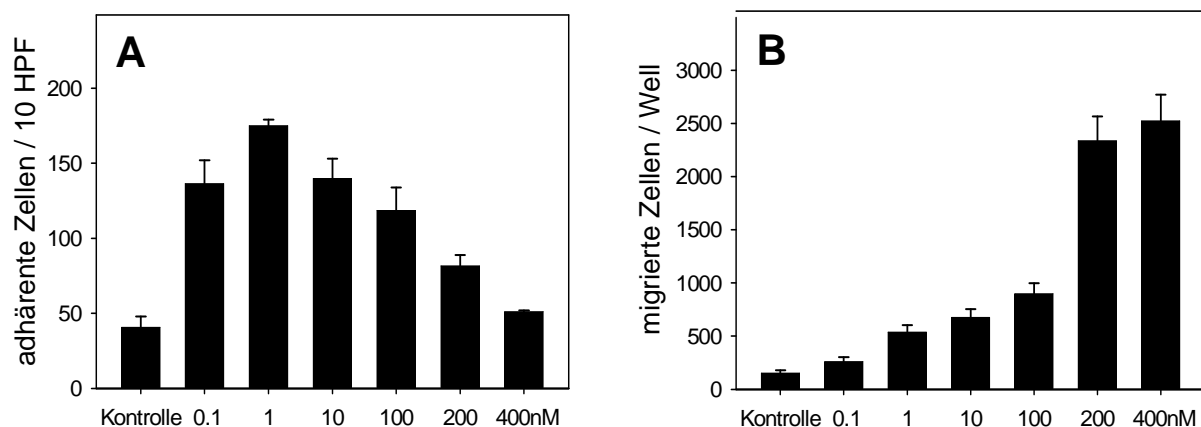


Abbildung 7: Tumorzelladhäsion und -migration *in vitro*

Zur Untersuchung der Zelladhäsion und -migration wurden Chemotaxiskammern mit 8 µm Porengröße im Filter verwendet. Die Kurven zeigen den dosisabhängigen Verlauf von Adhärenz (A) und Migration (B) nach SDF-1-Exposition. Unter Kontrollbedingungen adhärten und migrierten nur wenige Zellen (A, B), während es unter Stimulation mit niedrig dosiertem SDF-1 bei einer Konzentration von 1 nM zum stärksten Anstieg des Anteils adhärenter Zellen kam (A). Bei weiterer Erhöhung der SDF-1-Konzentration zeigte sich die Zelladhäsion wiederum abnehmend (A), wohingegen die Zellmigration unter Stimulation mit hohen SDF-1 Dosen exponentiell anstieg (B).

4.3 Bedeutung von SDF-1 für Tumorstadium und Angiogenese *in vivo*

Der Allgemeinzustand der BALB/c-Mäuse wurde durch die Implantation der Rückenhautkammern und der Tumorzellen nicht signifikant beeinträchtigt. Alle Tiere zeigten einen komplikationslosen postoperativen Verlauf und tolerierten die intravitalmikroskopischen Untersuchungen während der 14-tägigen Beobachtungszeit ohne Probleme. Anzeichen für Tumorkachexie zeigten sich bei keinem Versuchstier.

4.3.1 SDF-1-vermittelte Stimulation des Tumorwachstums

Nach Implantation der CT26.WT-GFP Zellen kam es in 100% der Fälle zur Etablierung von Tumoren, die in der Intravitalmikroskopie ein progredientes Wachstum zeigten (Abb.8A und B). Die lokale Applikation von SDF-1 am Tag 5 nach Implantation, verursachte eine signifikante Stimulation des Tumorwachstums, ablesbar an der Beschleunigung der Zunahme der Tumorfläche im Vergleich zur Kontrollgruppe. Dies zeigte sich insbesondere zu den späteren Beobachtungszeitpunkten (2,04 vs. 1,35 mm² an Tag 12; 3,10 vs. 1,87 mm² an Tag 14; Abb.8C).

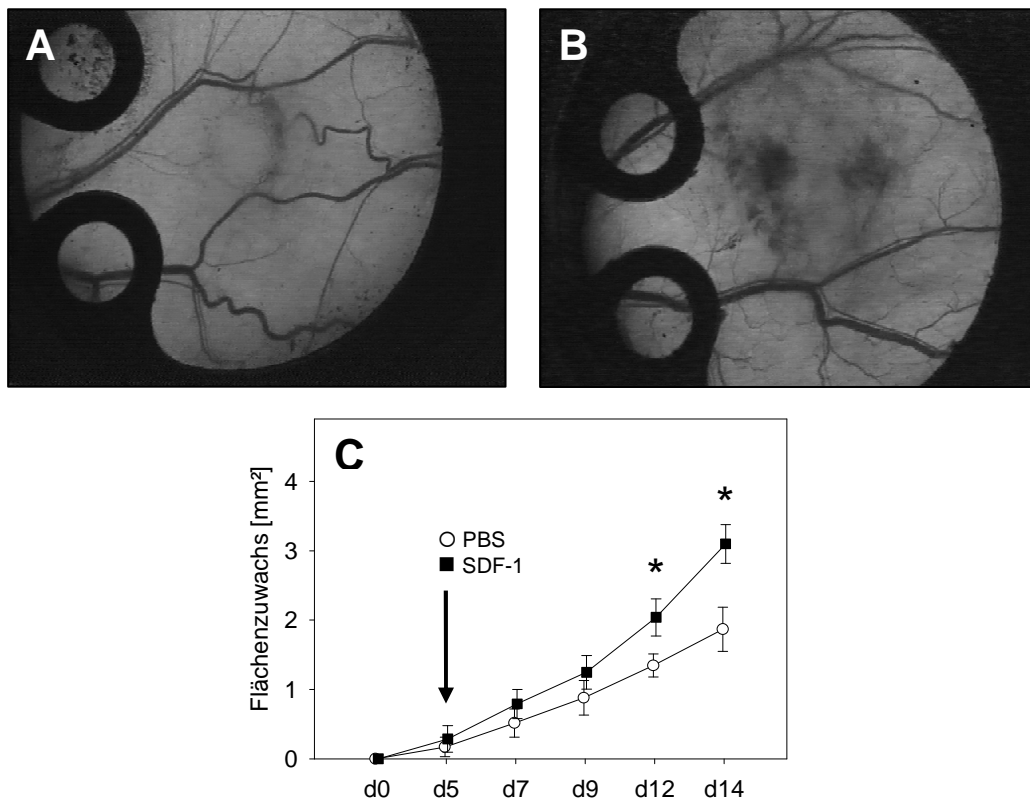


Abbildung 8: Stimulation des Tumorwachstum durch SDF-1 *in vivo*

Die Grafik zeigt den zeitlichen Verlauf des Tumorwachstums in der Rückenhautkammer nach Inokulation der BALB/c-Mäuse mit CT26.WT-GFP-Zellen (C) und stereomikroskopische Fotografien repräsentativer, 14 Tage alter Tumoren von Tieren, die an Tag 5 entweder eine lokale Kontrollbehandlung (A) oder 10µl 100 nM SDF-1(B) erhielten. Die quantitative Analyse der Tumorfläche (C) zeigte ein progredientes Tumorwachstum während der 14tägigen Beobachtungsperiode, sowohl in der Kontrollgruppe (Kreise), als auch bei den Tieren mit lokaler SDF-1-Applikation (Quadrate). Es zeigte sich eine signifikante Beschleunigung des Tumorwachstums nach SDF-1-Exposition. Angaben in MW ± SEM; *p<0,05 vs. Kontrolle; Vergrößerung (A+B) x5,5

4.3.2. SDF-1 induziert nachhaltige Veränderungen der Tumor-Angiogenese

Die semiquantitative Analyse der Tumor-Angiogenese zeigte, dass am Tag 7 nach Implantation in beiden Gruppen 40-50% der untersuchten Felder im Bereich des Tumorrandes neu gebildete Tumorgefäße aufwiesen. Interessanterweise stieg dieser Anteil in der Kontrollgruppe bis zum Tag 9 nur auf ~65% an, während er in der SDF-1-behandelten Gruppe zu diesem Zeitpunkt bereits mehr als 95% betrug (Abb.9C). Ab Tag 12 zeigten sich in beiden Gruppen in nahezu allen Feldern solche Tumorgefäße, deren Gefäßstruktur durch die, für Tumoren typische, chaotische Anordnung der Kapillaren gekennzeichnet war (Bergers G et al., 2003). Die gemessenen Kapillardichten im Tumorrand und Tumorzentrum waren hierbei jeweils vergleichbar und nicht signifikant unterschiedlich (Daten hier nicht dargestellt). Dennoch entwickelten die SDF-1-behandelten Tumoren bis zum Tag 9 signifikant höhere Kapillardichten im Bereich des Tumorrandes ($p < 0,05$) verglichen mit den unbehandelten Kontrollen (183,55 vs. 108,88 cm/cm^2). Am Tag 12 nach Inokulation mit den CT26.WT-GFP-Zellen war dieser Effekt jedoch nicht mehr nachweisbar.

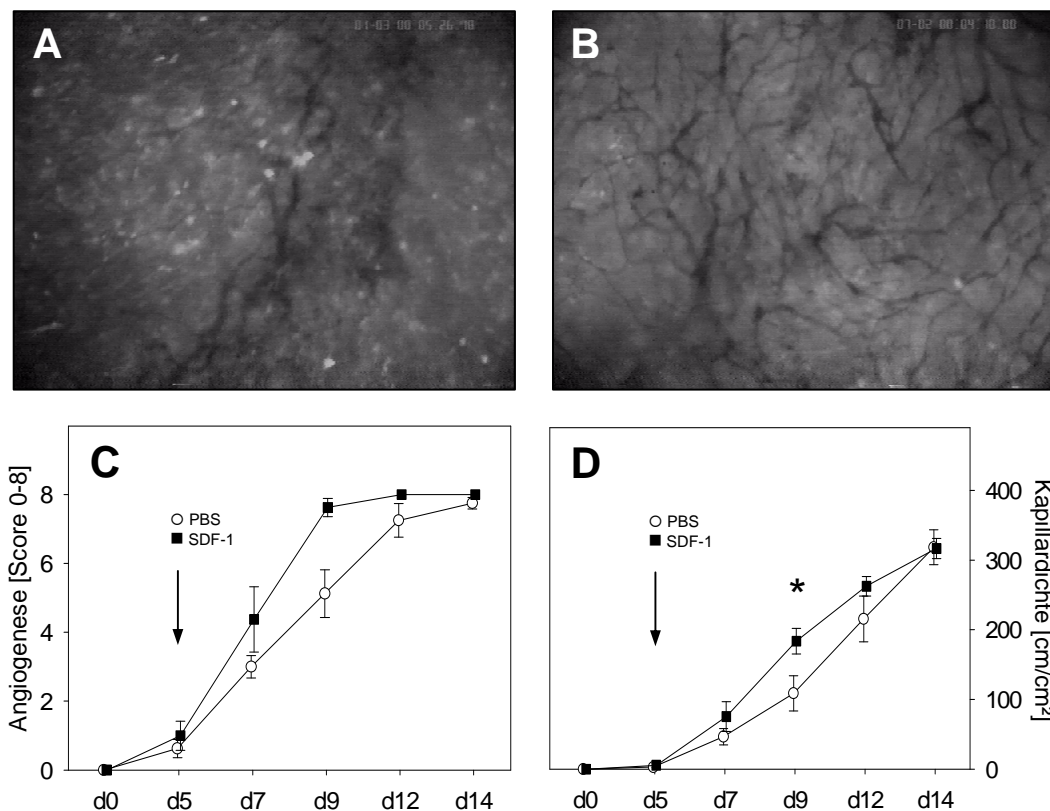


Abbildung 9: Angiogenese und Kapillardichte

Tumorkapillaren in der Intravitalmikroskopie in der Kontrollgruppe (A) und der SDF-1-behandelten Gruppe (B) am Tag 9 nach Tumorzellimplantation. Die semiquantitative Analyse der Angiogenese, angegeben als Score von 0-8 (C) in der Kontrollgruppe (Kreise) und der SDF-1-behandelten Gruppe (Quadrate) zeigte, dass es bis zum Tag 14 kontinuierlich zur Bildung neuer Tumorgefäße in nahezu allen Beobachtungsarealen kam (C), ohne dass Unterschiede zwischen den beiden Gruppen erkennbar waren. Analyse der Kapillardichte im Tumorrand (D) zeigte nur am Tag 9 eine signifikant höhere Kapillardichte im Vergleich zur Kontrollgruppe. Angaben in MW \pm SEM; * $p < 0,05$ vs. Kontrolle; Vergrößerung (A+B) $\times 64$

Da die Tumor-Angiogenese normalerweise mit einer VEGF-vermittelten Vasodilatation assoziiert ist, wurden die mittleren Kapillardurchmesser in den tumoreigenen Gefäßnetzwerken analysiert. Bis zum Ende der Beobachtungszeit zeigte sich nach SDF-1-Applikation gegenüber der Kontrollgruppe eine signifikante Vasodilatation sowohl im Tumorzentrum, als auch im Tumorrand ($p < 0,05$; Abb.10D; Daten für Tumorrand hier nicht dargestellt).

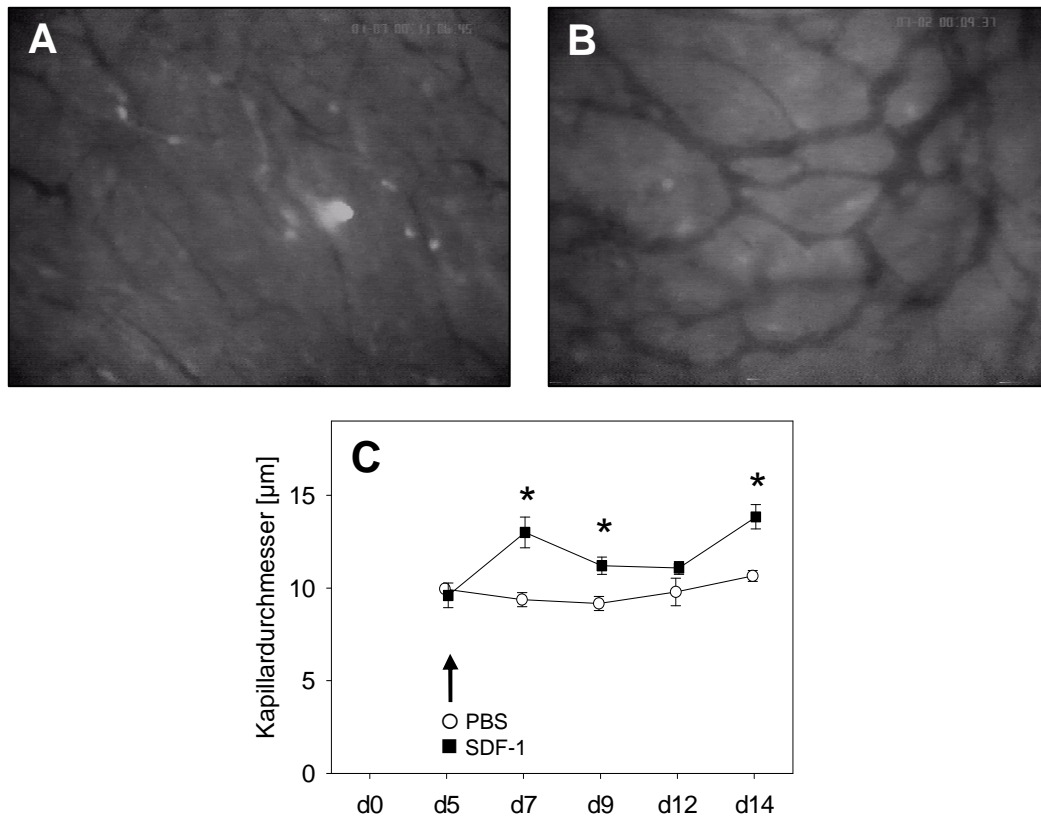


Abbildung 10: Gefäßarchitektur

Kapillardurchmesser Tumorgefäße in der Intravital-Fluoreszenzmikroskopie. Die intravitalmikroskopischen Bilder zeigen das Kapillarnetzwerk im Tumorzentrum von PBS-behandelten Kontrolltieren (A) und nach SDF-1-Behandlung (B) am Tag 14 nach Inokulation mit den CT26.WT-GFP-Zellen. Die Kapillardurchmesser wurden in der Computer-assistierten Bildanalyse für die Kontrollgruppe (Kreise) und die SDF-1-behandelten Tumoren (Quadrate) bestimmt. Auffällig sind die signifikant größeren Kapillardurchmesser der Tumorgefäße im Tumorzentrum nach lokaler SDF-1-Applikation. Angaben in MW \pm SEM; * $p < 0,05$ vs. Kontrolle; Vergrößerung (A+B) $\times 128$

Zusätzlich kam es im Verlauf zu petechialen Einblutungen in die Tumoren, als Ausdruck vaskulärer Leckagen. Die semiquantitative Analyse dieser Blutungszonen im Tumorzentrum (Abb.11C), zeigte in beiden Gruppen verstärkt Einblutungen zwischen Tag 5 und 9 nach Implantation der Zellen. Diese waren im Tumorrand ebenfalls nachweisbar (Daten hier nicht dargestellt). In der SDF-1-behandelten Gruppe wurde das Maximum dieser petechialen Blutungen zu einem früheren Zeitpunkt erreicht als in der Kontrollgruppe. Die Unterschiede zwischen Kontrolle und SDF-1 behandelter Gruppe waren jedoch nicht statistisch signifikant.

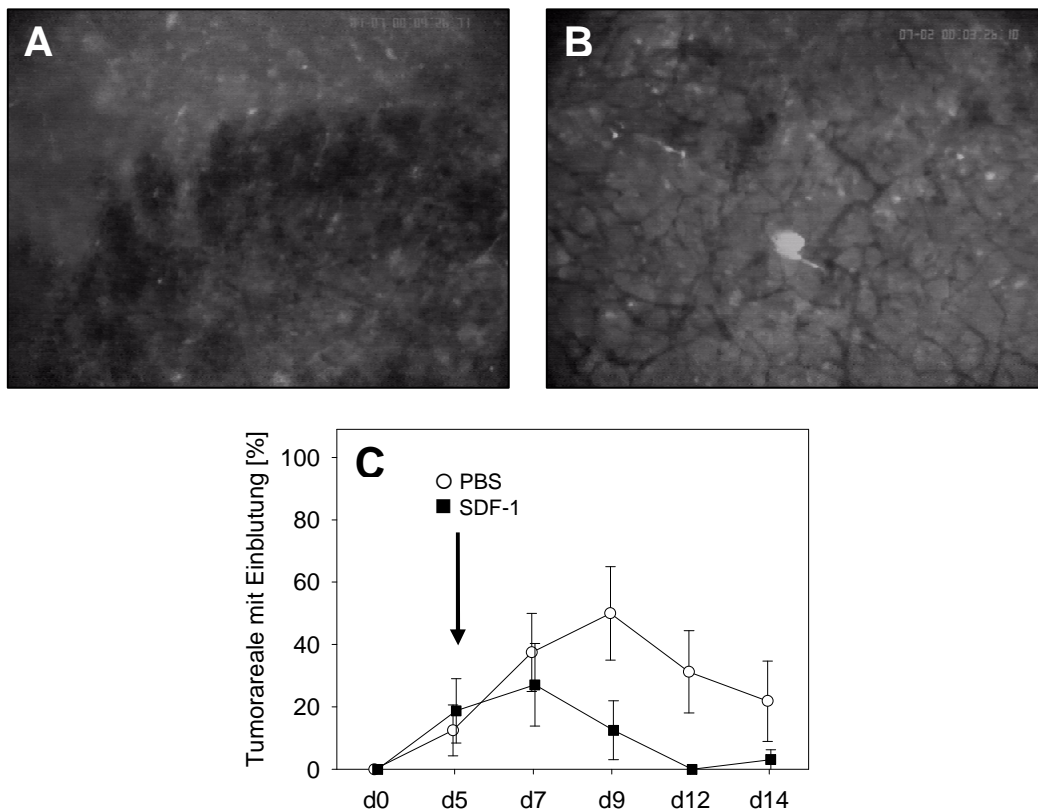


Abbildung 11: Gefäßleckagen mit konsekutiven petechialen Einblutungen

Zeitlicher Verlauf der petechialen Einblutungen in der Intravital-Fluoreszenzmikroskopie über einen Zeitraum von 14 Tagen: Die intravitalmikroskopischen Bilder zeigen die Einblutungen bei den Tumoren der Kontrollgruppe (A) und der SDF-1-behandelten Gruppe (B) am Tag 9. Die semiquantitative Analyse dieser Blutungszonen in der Kontrollgruppe (Kreise) und nach SDF-1-Exposition (Quadrate) zeigte das vermehrte Auftreten dieser Blutungen zwischen Tag 5 und 12 in beiden Gruppen, ohne dass sich signifikante Unterschiede nachweisen ließen. In der SDF-1-behandelten Gruppe wurde das Maximum der Einblutungen jedoch bereits zu einem früheren Zeitpunkt erreicht als in der Kontrollgruppe. Angaben in MW \pm SEM; Vergrößerung (A+B) x64

4.3.3 Tumorzellmigration während des Metastasenwachstums

Bereits am 5. Tag nach Tumorzell-Implantation zeigten sich in nahezu allen Beobachtungsarealen in unmittelbarer Umgebung des Tumorrandes migrierende CT26.WT-GFP-Zellen. Diese waren dank ihrer Eigenfluoreszenz sehr gut anhand ihrer spindelförmigen Zytoplasmaausläufer zu erkennen und während des 14-tägigen Beobachtungszeitraums zu jedem untersuchten Zeitpunkt nachweisbar. Ihr maximaler Abstand vom Tumorrand betrug 5 Tage nach Inokulation mit den CT26-Zellen in beiden Gruppen durchschnittlich $278 \pm 47 \mu\text{m}$, nahm im Verlauf kontinuierlich zu und belief sich am Tag 14 schließlich auf $475 \pm 116 \mu\text{m}$.

4.3.4 Histologische und immunhistochemische Charakteristika des Tumorwachstums

Die Hämatoxylin-Eosin-Färbung zeigte ein solides Wachstum der CT26.WT-GFP Tumoren in der Rückenhautkammer. Parallel zum signifikant gesteigerten Tumorwachstum, zeigte die semiquantitative Analyse am Tag 14 nach Implantation der Tumorzellen die Tendenz zu einem invasiveren Wachstumsmuster in Form einer verstärkten Infiltration der Muskelschicht durch die SDF-1 exponierten Tumore von $23,3 \pm 9,5\%$ der Tumorbasis, verglichen mit $10,5 \pm 6,3\%$ in der Kontrollgruppe.

In der Immunhistologie zeigten sich knapp 40% der Zellen in Kontrolltumoren positiv für den Proliferationsmarker PCNA (Abb.12A und E). Interessanterweise steigerte die Applikation von SDF-1 die Rate PCNA-positiver Zellen auf $>70\%$ (Abb.12B und E). Dies deutet auf eine direkte Stimulation der Zellproliferation durch SDF-1 hin.

Zum Nachweis apoptotischer Tumorzellen wurde gespaltene Caspase-3 immunhistochemisch dargestellt. An Tag 14 waren $0,05\%$ der Zellen in den SDF-1 exponierten Tumoren Caspase-3-positiv. In der Kontrollgruppe betrug deren Anteil $0,30\%$ (Abb.12C und D). Diese Differenz war statistisch signifikant ($p < 0,05$; Abb.12F). Somit konnte die insgesamt geringe Apoptoserate der CT26.WT-GFP-Tumorzellen durch die Applikation von SDF-1 weiter gesenkt werden.

In der CXCR4-Immunhistochemie konnten einige Rezeptor-positive Zellen im Tumorzentrum und im Randbereich nachgewiesen werden (Abb.12G). Die quantitative Analyse der CXCR4-Expression im gesamten Tumor zeigte, dass die lokale SDF-1-Applikation die Rate positiv markierter Zellen im Vergleich zur Kontrollgruppe nicht signifikant beeinflusste ($8,6 \pm 3,8\%$ vs. $5,9 \pm 4,3\%$; Abb.12H).

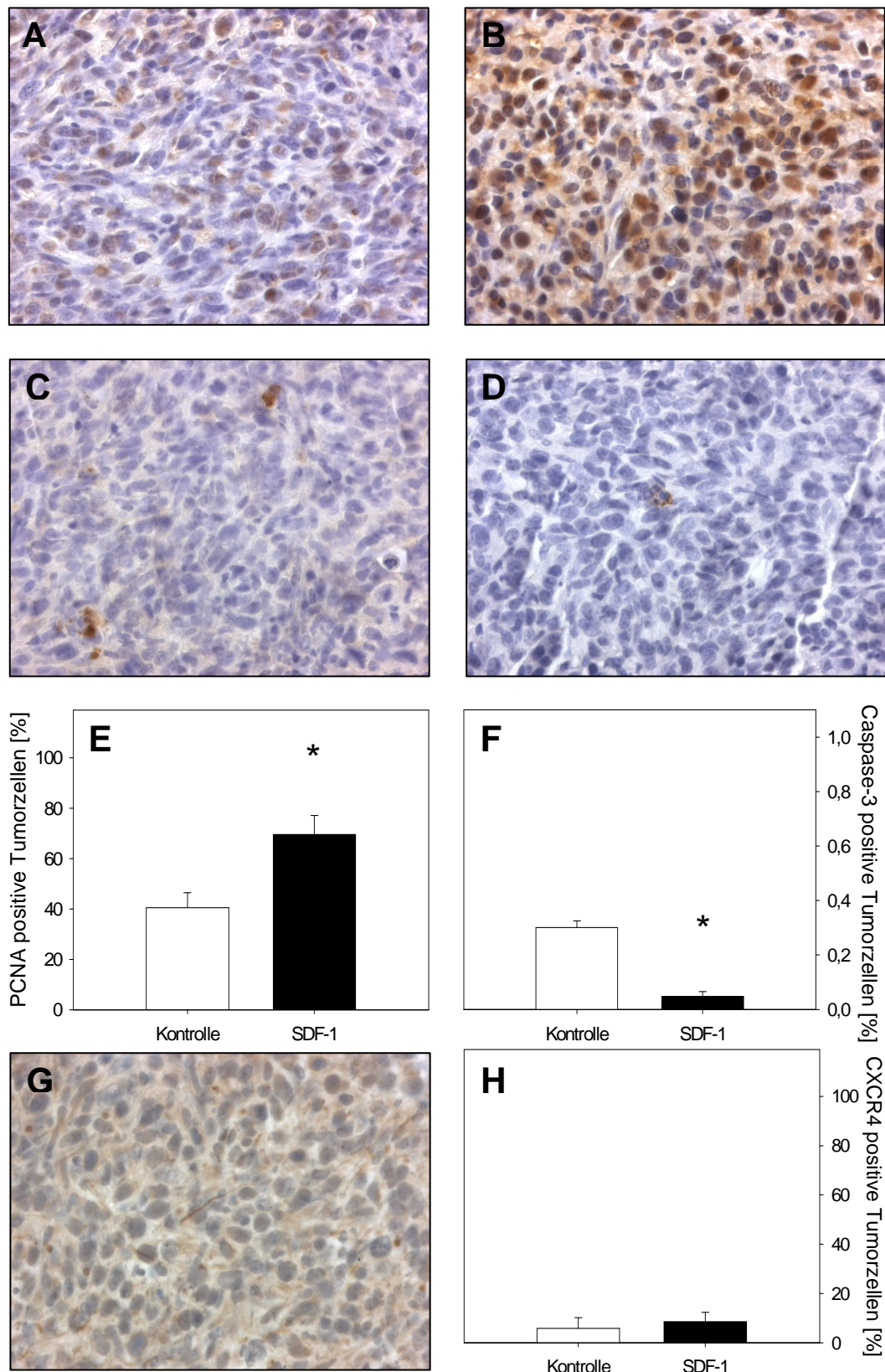


Abbildung 12: Tumorzellproliferation, Apoptose und CXCR4-Immunhistochemie

PCNA (A, B), Caspase-3 (C, D) und CXCR4 (G) Immunhistochemie von Kontroll- (A, C) und SDF-1-behandelten Tumoren (B, D, G) an Tag 14: Die quantitative Analyse zeigte signifikant mehr PCNA positiv markierte Tumorzellen nach SDF-1-Exposition im Vergleich zur Kontrolle (E). Bei insgesamt nur wenigen Caspase-3-positiven Tumoren in beiden Gruppe, führte die SDF-1-Applikation zu einer weiteren Reduktion des Apoptosemarker gegenüber der Kontrolle (F). Die quantitative Auswertung der CXCR4-positiven Zellen zeigte in beiden Gruppen an Tag 14 nur noch eine geringe CXCR4-Expression. Angaben in MW \pm SEM; * $p < 0,05$ vs. Kontrolle; Vergrößerung (A-D, G) x280.

4.4 Tumorwachstum und Angiogenese unter SDF-1-Blockade nach Leberresektion

4.4.1 Auswirkungen der Neutralisation von SDF-1 auf das Tumorwachstum

Ähnlich wie die nicht-resezierten, zeigten auch die Leber resezierten Tiere einen komplikationslosen postoperativen Verlauf bis zum Ende der Beobachtungszeit. In allen 3 Versuchsgruppen kam es nach Implantation der Tumorzellen und nach 30%iger Leberresektion (Phx) in 100% der Fälle zur Etablierung eines soliden Tumors in der Rückenhautkammer, welcher ein progredientes Wachstum zeigte. Die intraperitoneale Injektion des Anti-SDF-1-Antikörpers (MAB310, R&D Systems) ab dem Tag der Tumorzell-Implantation (MAB-0) unterdrückte das Tumorwachstum geringfügig bis zum 7. postoperativen Tag, erkennbar am reduzierten Flächenzuwachs in diesem Zeitraum (0,68 vs. 1,01 vs. 1,01 mm², d7; Abb.13). Anschließend kam es jedoch zu einer kompensatorischen Beschleunigung des Tumorwachstums mit einem, im Vergleich zur Kontrollgruppe (KON-2) gesteigerten Flächenzuwachs (3,54 vs. 3,47 vs. 2,46 mm², d14). Die Applikation von Anti-SDF-1 ab dem 5. postoperativen Tag (MAB-5) führte initial nicht zu einer Unterdrückung des Tumorwachstums. Bereits ab Tag 9 zeigte sich in dieser Gruppe ein verstärkter Flächenzuwachs gegenüber der Kontrollgruppe (Abb.13).

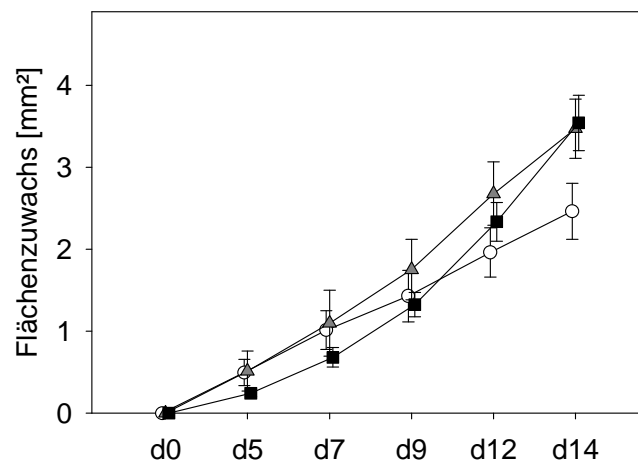


Abbildung 13: Tumorwachstum in der Rückenhautkammer nach Phx und SDF-1-Blockade

Zeitlicher Verlauf des Wachstums von CT26.WT-GFP-Tumoren in der Rückenhautkammer nach 30% Phx und unter Blockade von SDF-1 ab Tag 0 (MAB-0, Quadrate) oder ab Tag 5 (MAB-5, Dreiecke) nach Tumorzellimplantation. Die quantitative Analyse der Tumorfläche in der Intravitalmikroskopie zeigte ein progredientes Tumorwachstum während der 14tägigen Beobachtungsperiode in allen Gruppen. Auffällig ist die anfängliche geringfügige Suppression des Tumorwachstums in der Gruppe MAB-0 (Quadrate), im Vergleich zur Kontrollgruppe (Kreise). An Tag 14 nach Inokulation mit den CT26.WT-GFP-Zellen zeigen die Anti-SDF-1-behandelten Tiere gegenüber der Kontrolle allerdings ein gesteigertes Tumorwachstum. Die Unterschiede waren jedoch nicht statistisch signifikant. Angaben in MW \pm SEM

4.4.2 Effekt der SDF-1-Blockade auf die Tumor-Angiogenese

Die semiquantitative Analyse der Tumor-Angiogenese zeigte, dass die Applikation von SDF-1 ab dem Tag der Tumorzellimplantation zu einer signifikanten Beschleunigung der Angiogenese führte (Abb.14D). In der Gruppe MAB-0 zeigten sich am Tag 7 bereits in ~90% der untersuchten Felder im Tumor neu gebildete Tumorgefäße (14C), während dies zu diesem Zeitpunkt nur bei ~25% der Felder in der Kontrollgruppe (14A) und bei ~50% der Felder in der Gruppe MAB-5 (14B) der Fall war. Bereits am Tag 9 nach Tumorimplantation wiesen alle untersuchten Felder in der Gruppe MAB-0 neue Gefäße auf, wohingegen dies bei den beiden anderen erst ab dem 12. Tag der Fall war (Abb.14D).

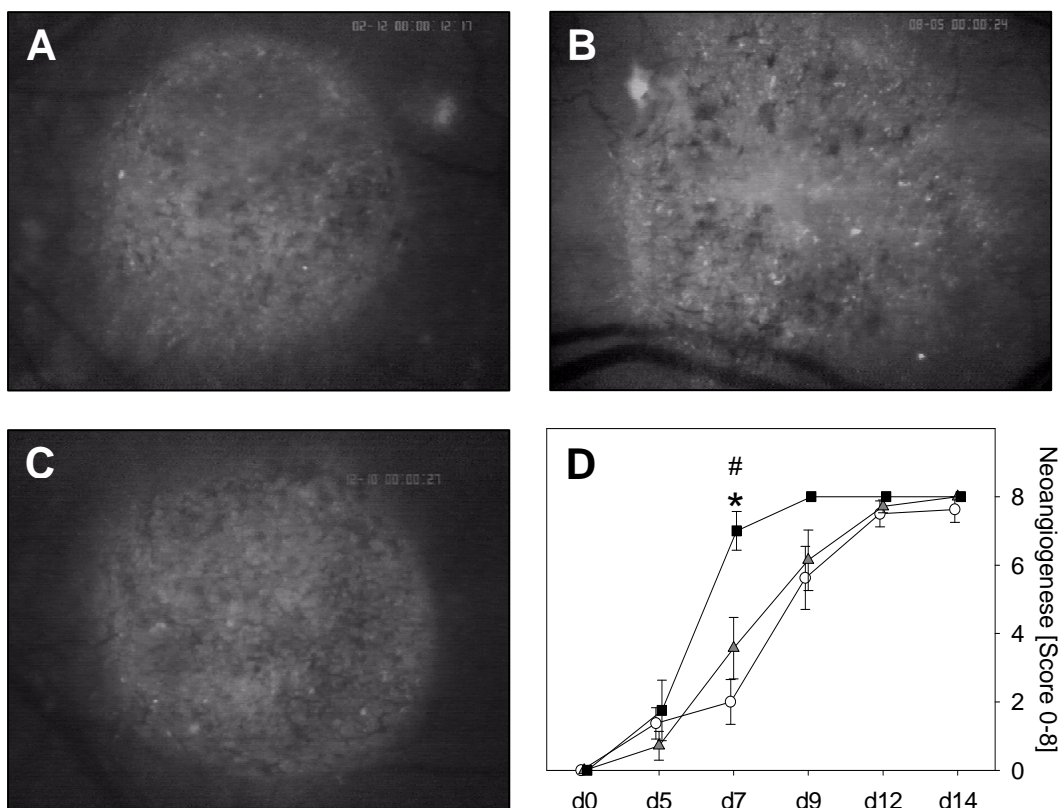


Abbildung 14: Tumor-Angiogenese unter SDF-1-Blockade

Zeitlicher Verlauf der Tumor-Angiogenese der CT26.WT-GPF-Tumoren unter SDF-1-Blockade in der Intravitalmikroskopie über einen Zeitraum von 14 Tagen. Die fluoreszenzmikroskopischen Bilder zeigen das Kapillarnetzwerk der Tumoren in der Kontrollgruppe (A) und in den Anti-SDF-1-behandelten Gruppen (B=MAB-5, C=MAB-0) am Tag 7 nach Leberresektion und Implantation der Tumorzellen. Die semiquantitative Analyse des erstmaligen Auftretens neu gebildeter Tumorkapillaren, angegeben als Score von 0-8 (D) in der Kontrollgruppe (Kreise) und in den Antikörper-behandelten Tumoren (MAB-0=Quadrate, MAB-5=Dreiecke) zeigte, dass in MAB-0 bereits am Tag 7 in nahezu allen untersuchten Feldern neu gebildete Tumorgefäße nachweisbar waren, während dies in den beiden übrigen Gruppen zu diesem Zeitpunkt nur zu 25% (KON-2) bzw. 50% (MAB-5) der Fall war. Angaben in MW \pm SEM; * $p < 0,05$ vs. KON-2; # $p < 0,05$ vs. MAB-5; Vergrößerung (A+B) $\times 25$

4.4.3 Veränderungen der Gefäßarchitektur unter SDF-1-Blockade

Die Gefäßdichte in den neu gebildeten, chaotisch angeordneten Kapillarnetzwerken der Tumore zeigte in keiner Versuchsgruppe Unterschiede zwischen Tumorrand und -zentrum. Allerdings zeigte sich in der Gruppe MAB-0 bereits ab Tag 7 eine, gegenüber den anderen Gruppen signifikant höhere Kapillardichte, sowohl im Tumorrand, als auch im Tumorzentrum (272,85 vs. 60,41 vs. 49,81 cm/cm², Tumorrand; 270,56 vs. 81,43 vs. 65,39 cm/cm², Tumorzentrum; $p < 0,05$; Abb.15C und 15D). In der Gruppe MAB-5 war die Kapillardichte ab Tag 12 im Tumorzentrum und am Tag 14 auch im Tumorrand im Vergleich zu Kontrolltumoren signifikant höher ($p < 0,05$; Abb.15C und 15D).

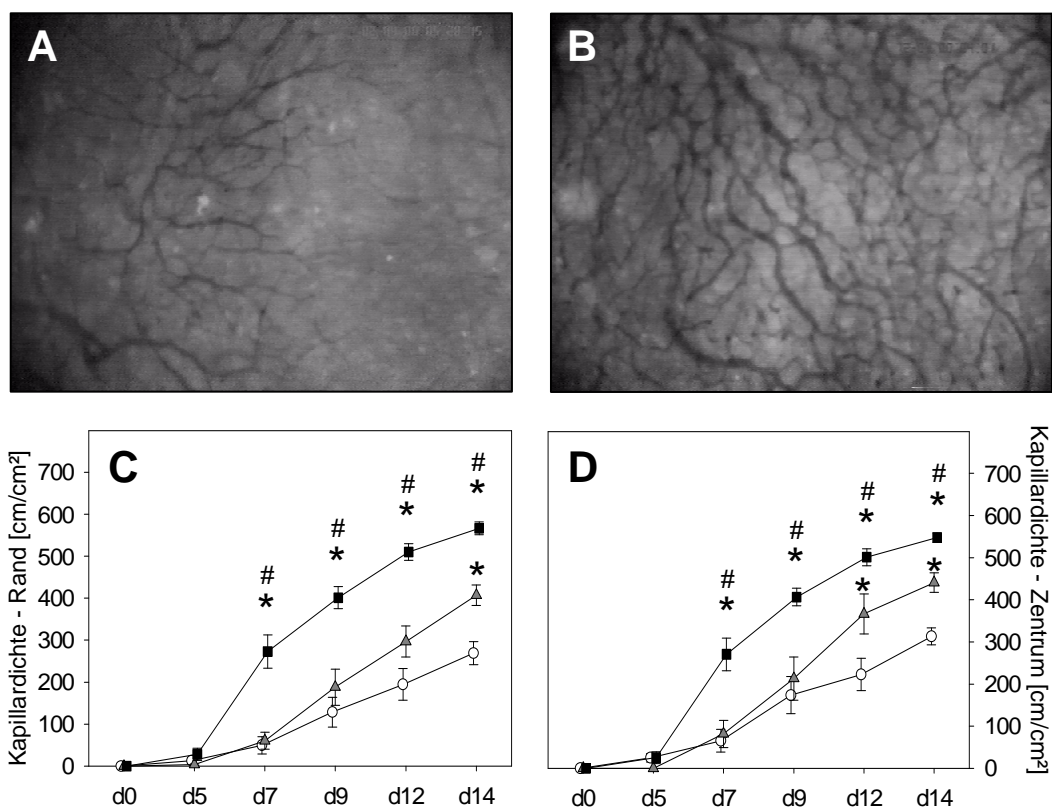


Abbildung 15: Kapillardichte der neu gebildeten Tumorgefäße

Die intravitalmikroskopischen Bilder (A, B) zeigen neu gebildete Kapillaren in Tumoren von Leber resezierten Kontrolltieren (A) und nach SDF-1-Behandlung ab Tag 0 (B) an Tag 14. Die quantitative Analyse der Kapillardichte zeigte in der Gruppe MAB-0 (Quadrate) bereits ab Tag 7 signifikant höhere Gefäßdichten, verglichen mit der Kontrollgruppe (Kreise), sowohl im Tumorrand (C), als auch im Zentrum (D). Auch in der Gruppe MAB-5 (Dreiecke) zeigten die Tumoren am Ende des Beobachtungszeitraums deutlich höhere Kapillardichten als die Kontrolle. Angaben in MW \pm SEM; * $p < 0,05$ vs. KON-2; # $p < 0,05$ vs. MAB-5; Vergrößerung (A+B) x64

Die Analyse der mittleren Kapillardurchmesser zeigte an den Tagen 9-14 interessanterweise signifikant dilatierte Gefäße in der Kontrollgruppe im Vergleich zu den beiden Antikörper-behandelten Gruppen ($p < 0,05$; Abb.16D). Signifikante Unterschiede zwischen den Kapillardurchmessern im Tumorrand und im Tumorzentrum fanden sich hierbei nicht (Daten hier nicht dargestellt).

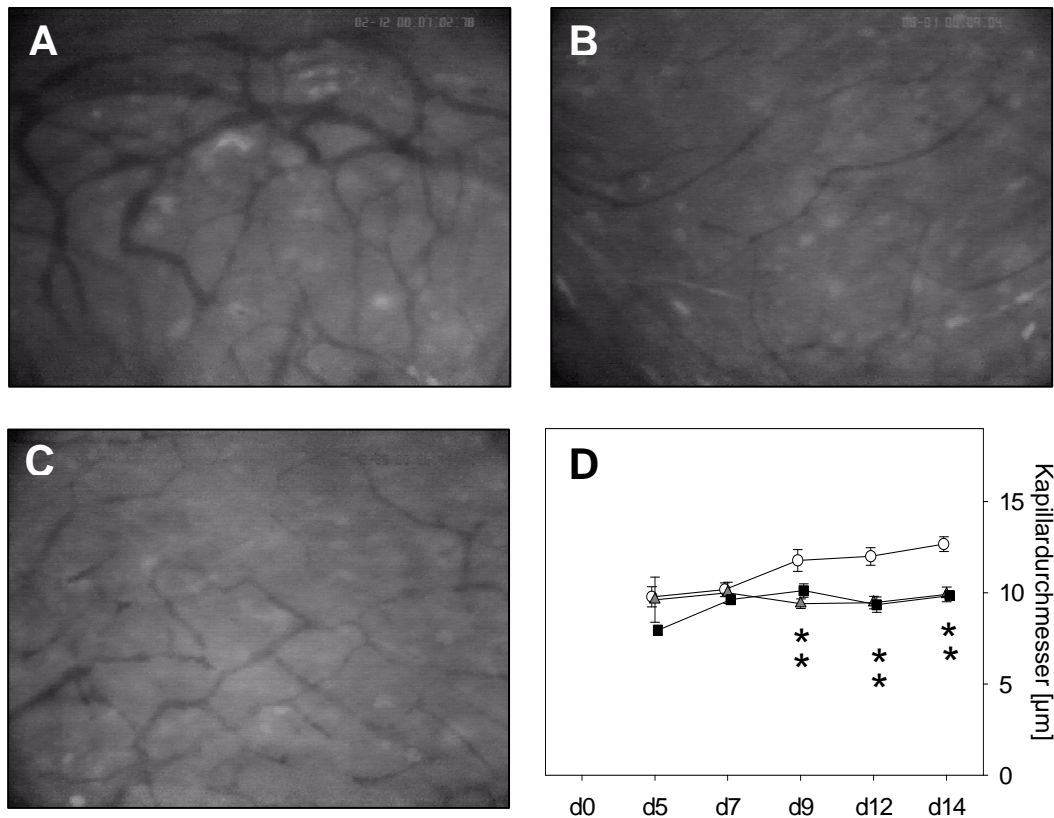


Abbildung 16: Kapillardurchmesser

Intravitalmikroskopische Bilder der Tumorkapillaren von Tumoren in der Kontrollgruppe (A) und den Anti-SDF-1-behandelten Gruppen (MAB-5=B, MAB-0=C) am Tag 14. Die quantitative Analyse der Gefäßdurchmesser zeige die deutlich dilatierten Kapillaren in der Kontrollgruppe (Kreise), neben den Gefäßen geringeren Kalibers der Anti-SDF-1-behandelten Gruppen (MAB-5=Dreiecke, MAB-0=Quadrate). Angaben in MW \pm SEM; * $p < 0,05$ vs. KON-2; Vergrößerung (A-C) $\times 128$

Petechiale Blutungen im Tumor, als Anzeichen von Gefäßleckagen in der Frühphase der Angiogeneese, waren vornehmlich an Tag 5 und 7 in der Gruppe MAB-0 zu finden (Abb.17A). Zu diesen Zeitpunkten zeigten sich Einblutungen in bis zu 80% der untersuchten Felder im Tumor, während diese in den beiden übrigen Gruppen nur in ~20% der Felder zu beobachten waren ($p<0,05$; Abb.17C).

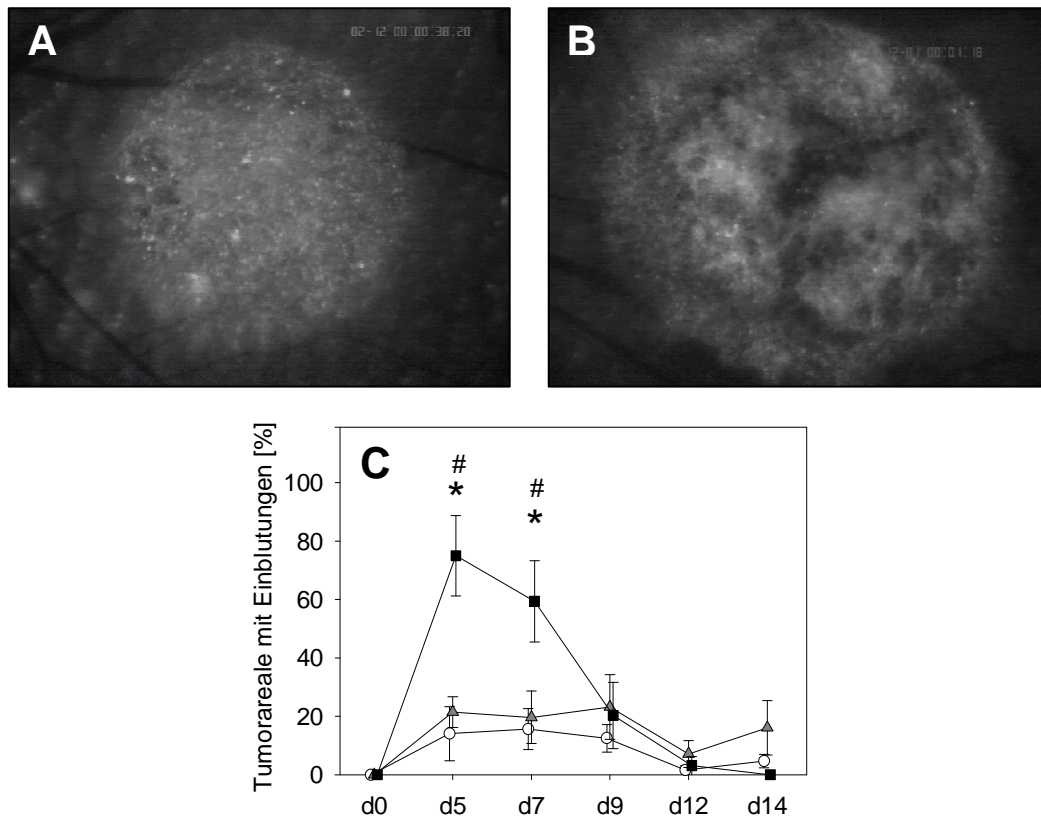


Abbildung 17: Gefäßleckagen mit konsekutiven petechialen Einblutungen unter SDF-1-Blockade

Zeitlicher Verlauf des Auftretens von petechialen Einblutungen in die CT26.WT-GFP-Tumoren über einen Zeitraum von 14 Tagen. Die intravitalmikroskopischen Bilder zeigen die Blutungszonen bei den Tumoren der Kontrollgruppe (A) und in der Gruppe MAB-0 (B) an Tag 7. Die semiquantitative Analyse dieser Blutungszonen in der Kontrollgruppe (Kreise) und nach Anti-SDF-1-Behandlung (MAB-0=Quadrate, MAB-5=Dreiecke) zeigte an den Tagen 5 und 7 signifikant mehr Einblutungen in die Tumoren in der Gruppe MAB-0 als in den beiden übrigen Gruppen (C). Angaben in MW \pm SEM; * $p<0,05$ vs. KON-2; # $p<0,05$ vs. MAB-5; Vergrößerung (A+B) x25

Da der Prozess der Angiogeneese und das Auftreten von Gefäßleckagen VEGF-assoziierte Prozesse sind, wurde die Expression von VEGF mittels Western Blot analysiert. In vitro exprimierten die CT26.WT-GFP-Zellen kein VEGF-Protein, wohingegen VEGF bei den Tumoren in die Rückenhautkammer zu jedem untersuchten Zeitpunkt nachgewiesen werden konnte (Abb.12). An den Tagen 5 und 9 nach Tumorzell-Implantation zeigte sich bei den Tumoren von Tieren der Gruppe MAB-0 zudem eine deutlich höhere VEGF-Expression im Vergleich zur Kontrollgruppe. Deren Maximum korrelierte hierbei gut mit dem Maximum der vorher beschriebenen petechialen Einblutungen in die Tumoren.

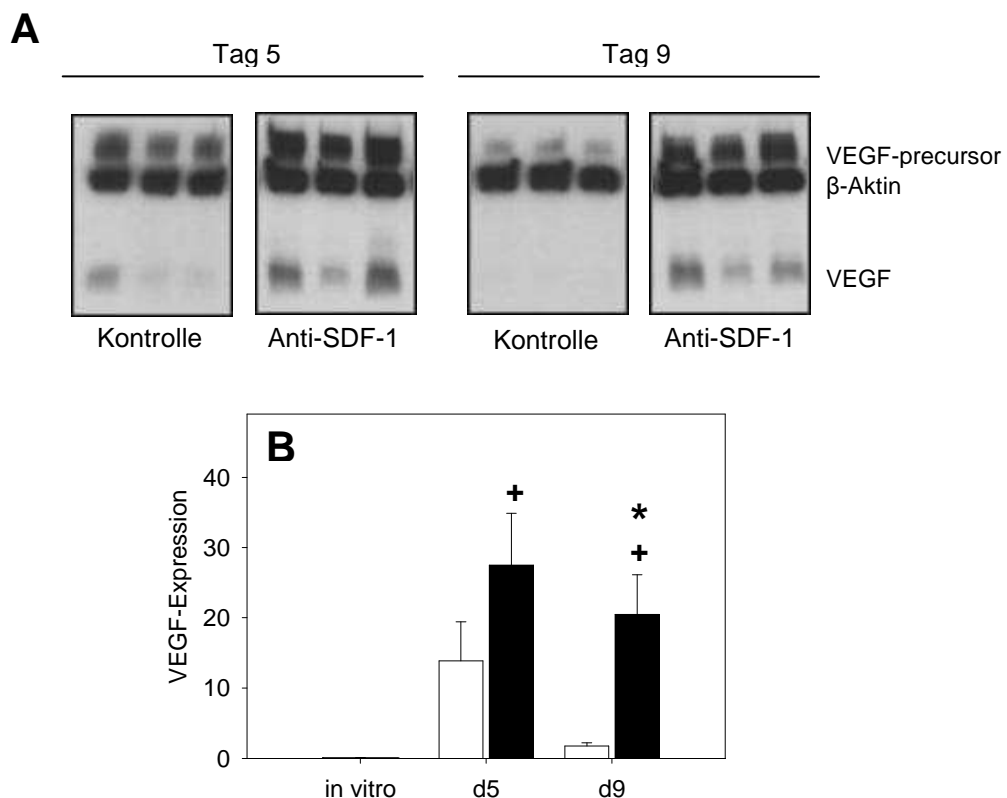


Abbildung 18: Western Blot-Analyse der VEGF-Expression

Zeitlicher Verlauf der VEGF-Expression (B) der Tumoren in der Kontrollgruppe (weiße Balken) und in der Gruppe MAB-0 (schwarze Balken) im Western Blot bis zum Tag 9. Die densitometrische Analyse der VEGF-Banden (A) zeigte an Tag 5 und 9 nach Implantation CT26.WT-Zellen eine deutlich höhere VEGF-Expression nach SDF-1-Blockade. Angaben in MW \pm SEM; +p<0,05 vs. in vitro; *p<0,05 vs. Kontrolle

4.4.4 Veränderungen der Tumorzell-Migration nach SDF-1-Blockade

Die Analyse der Tumorzell-Migration nach Blockade von SDF-1 zeigte migrierende, spindelförmige Tumorzellen ab dem 5. Tag nach Tumorzell-Implantation, die sowohl in der Kontrollgruppe, als auch in den in beiden Anti-SDF-1-behandelten bis zum Ende des Beobachtungszeitraums nachweisbar waren. Die Zahl der migrierenden Tumorzellen unterschied sich zwischen den einzelnen Gruppen nicht signifikant und betrug durchschnittlich zwischen 12 ± 3 (Tag 5) und 16 ± 6 (Tag14) Zellen pro $0,05 \text{ mm}^2$ -Areal. Bei der Betrachtung des maximalen Abstands der migrierenden Zellen fielen in den beiden Antikörper-behandelten Gruppen MAB-0 und MAB-5 durchgehend größere Abstände zwischen den am weitesten entfernten Zellen und dem Tumorrand im Vergleich zur Kontrollgruppe auf. Diese lagen in der Gruppe MAB-0 kontinuierlich über $400 \mu\text{m}$ und damit an 4 von 5 Beobachtungszeitpunkten signifikant höher als in der Kontrollgruppe, in der um die $300 \mu\text{m}$ erreicht wurden (Tab.1). Die Neutralisierung von SDF-1 führte also bei keinem angewandten Dosierungs-Schema zu einer Beeinträchtigung der Tumorzell-Migration.

	Tag 5	Tag 7	Tag 9	Tag 12	Tag 14
Zellzahl [n]					
KON-2	13 +/- 1	16 +/- 3	17 +/- 4	18 +/- 4	15 +/- 4
MAB-5	13 +/- 4	17 +/- 6	19 +/- 4	17 +/- 3	16 +/- 3
MAB-0	12 +/- 4	16 +/- 4	16 +/- 6	18 +/- 8	18 +/- 9
Zellabstand [μm]					
KON-2	281,69 +/- 65,76	288,56 +/- 61,10	307,26 +/- 54,32	327,39 +/- 72,25	345,89 +/- 124,25
MAB-5	340,38 +/- 54,56	369,94 +/- 56,78	357,14 +/- 51,52	439,78 +/- 80,77	485,34 +/- 84,74
MAB-0	424,39 +/- 143,15	408,98 +/- 110,35	423,67 +/- 126,93	465,94 +/- 166,67	563,07 +/- 421,86

Tabelle 3: Parameter der Tumorzellmigration – Abstand und Anzahl migrierender Zellen

4.4.5 Histomorphologie der Tumoren nach SDF-1-Blockade

In der Hämatoxylin-Eosin-Färbung zeigte sich in der Gruppe MAB-0 eine signifikant verstärkte Infiltration von Muskulatur und Subkutangewebe durch die CT26.WT-GFP-Zellen im Vergleich zur Kontrolle und zur Gruppe MAB-5 ($p < 0,05$; Abb.19). Zwischen den beiden letztgenannten Gruppen waren keine Unterschiede bezüglich der Tumordinfiltration festzustellen (Abb.19D).

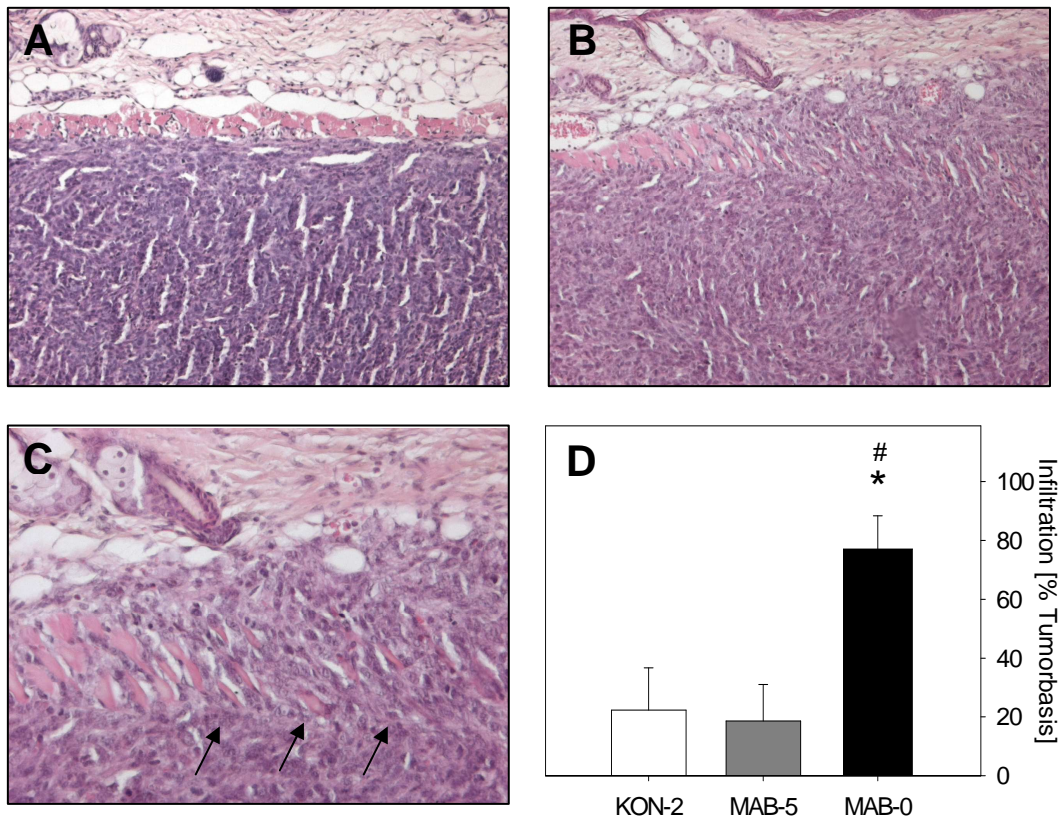


Abbildung 19: Tumordinfiltration der Muskulatur in der Histologie

Infiltration der quergestreiften Muskulatur der Rückenhautkammer durch die CT26.WT-GFP-Tumoren in der HE-Färbung am Tag 14 nach Zellimplantation. Die Tumoren in der Kontrollgruppe (A) zeigten nur eine geringfügige Infiltration der Muskelschicht, ebenso die Tumoren der Gruppe MAB-5. Demgegenüber kam es in der Gruppe MAB-0 zur ausgeprägten Invasion der quergestreiften Muskulatur mit Infiltration der darunter liegenden Bindegewebsschicht (B, C) durch die Tumorzellen. Die Invasion wurde anhand des prozentualen Anteils der Infiltration an der Tumorbasis quantifiziert (D). Angaben in MW \pm SEM; * $p < 0,05$ vs. KON-2; # $p < 0,05$ vs. MAB-5; Vergrößerung (A+B) $\times 70$; (C) $\times 140$

Die immunhistochemische Markierung von gespaltener Caspase-3 als Apoptosemarker zeigte sich am Tag 14 nach Implantation bei weniger als 0,5% der Tumorzellen in der Kontrollgruppe positiv (Abb.20A). Unter Blockade von SDF-1 kam es zu einer weiteren Reduktion der Rate positiver Tumorzellen auf ~0,1% in beiden Behandlungsgruppen ($p < 0,05$; Abb.20C).

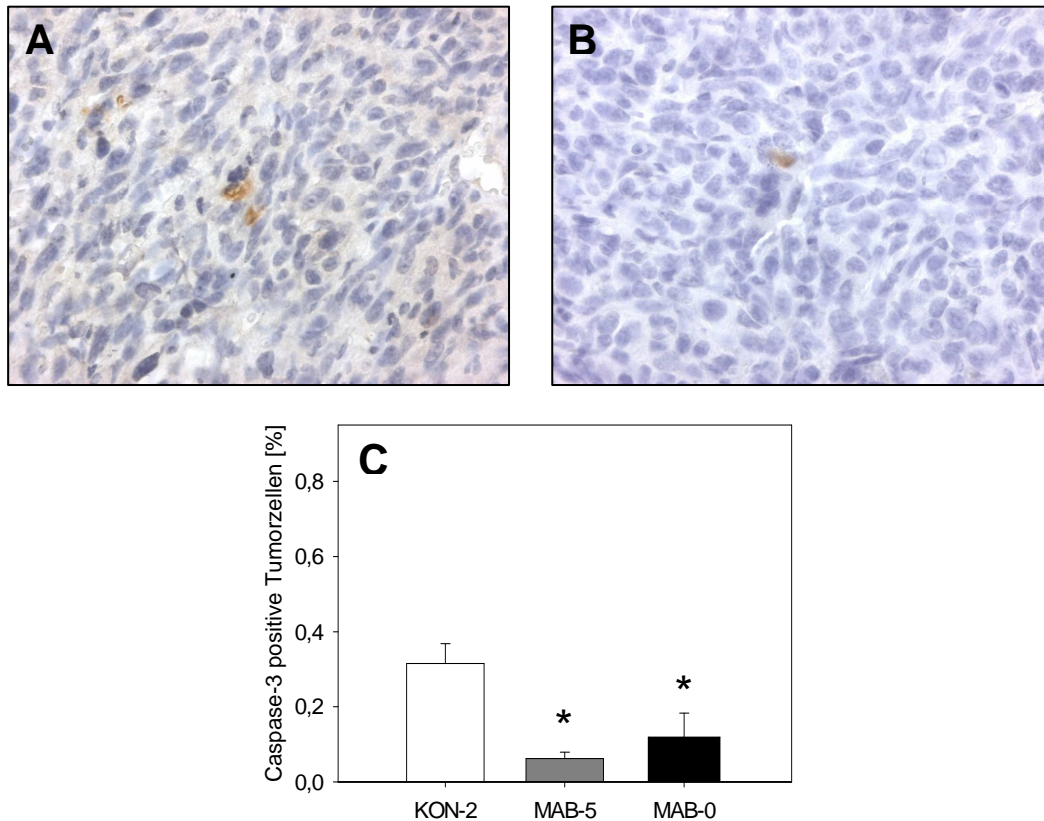


Abbildung 20: Tumorzell-Apoptose in der Immunhistochemie

Immunhistochemische Darstellung Caspase-3-positiver Tumorzellen in 14 Tage alten CT26.WT-GFP-Tumoren nach partieller Leberresektion ohne (A) und mit Anti-SDF-1-Behandlung (B). Die quantitative Analyse (C) zeigte am Tag 14 nach Tumorzellimplantation eine insgesamt niedrige Apoptoserate. In den beiden Antikörper-behandelten Gruppen (MAB5=grauer Balken, MAB0=schwarzer Balken) war die Zahl Caspase-3-positiver Zellen gegenüber der Kontrollgruppe (weißer Balken) zu diesem Zeitpunkt signifikant reduziert (C). Angaben in MW \pm SEM; * $p < 0,05$ vs. Kontrolle; Vergrößerung (A,B) x280

Der immunhistochemische Nachweis von PCNA als Proliferationsmarker zeigte eine positive Markierung bei 70-80% der Tumorzellen, ohne signifikante Unterschiede zwischen allen drei Gruppen (Abb.21C). Der PCNA-Nachweis mittels Western-Blot-Analyse an den Tagen 5 und 9 nach Tumorzellimplantation einen Anteil von 35-40% proliferierender Tumorzellen sowohl in der unbehandelten Kontrolle, als auch in der Gruppe MAB-0, während die CT26.WT-GFP-Zellen in der Zellkultur Proliferationsraten von ~70% aufwiesen. Nach Implantation in die Rückenhautkammer zeigten die Tumorzellen folglich eine, im Vergleich zu Zellkultur signifikant reduzierte Proliferationsraten ($p < 0,05$, 21D).

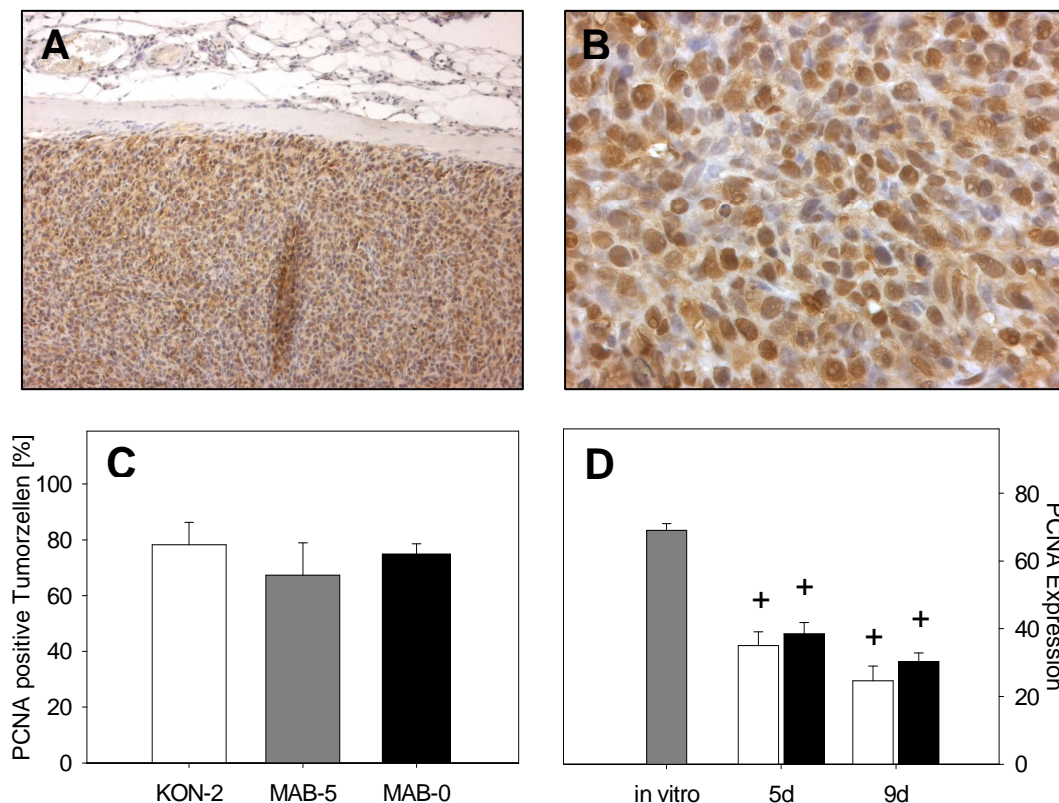


Abbildung 21: Tumorzell-Proliferation und Expression des Proliferationsmarkers PCNA

Immunhistochemische Darstellung PCNA-positiver Tumorzellen in 14 Tage alten CT26.WT-GFP-Tumoren nach Anti-SDF-1-Behandlung ab Tag 0 (A,B). Die quantitative Analyse zeigte zu diesem Zeitpunkt eine positive Markierung für PCNA bei 70-80% der Tumorzellen ohne signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Versuchsgruppen (C). Auch in der densitometrischen Analyse der Banden für PCNA im Western Blot waren keine Unterschiede bezüglich der PCNA-Expression unter SDF-1-Blockade (MAB-0=schwarzer Balken) oder unter Kontrollbedingungen (weiße Balken) an den Tagen 5 und 9 nach Tumorzellimplantation nachweisbar (D). Die CT26.WT-GFP-Zellen zeigten in vivo zu jedem der untersuchten Zeitpunkte eine deutlich niedrigere PCNA-Expression als in vitro (grauer Balken). Angaben in MW \pm SEM; * $p < 0,05$ vs. Kontrolle; + $p < 0,05$ vs. in vitro; Vergrößerung (A) x70; (B) x280

Zur Untersuchung der Expression des SDF-1-Rezeptors CXCR4 wurden an den Tagen 5 und 9 nach Tumorzell-Implantation Western Blot-Analysen durchgeführt an Kontrolltumoren und Anti-SDF-1-behandelten Tumoren durchgeführt (MAB-0). Zusätzlich wurden CT26.WT-Zellen aus der Zellkultur untersucht. Die densitometrische Analyse der Banden für CXCR4 im Western Blot (Abb.22), zeigte in der Versuchsgruppe MAB-0 eine beständig erhöhte CXCR4-Expression durch die Tumorzellen im Vergleich den CT26.WT-GFP-Zellen *in vitro* und zur Kontrollgruppe.

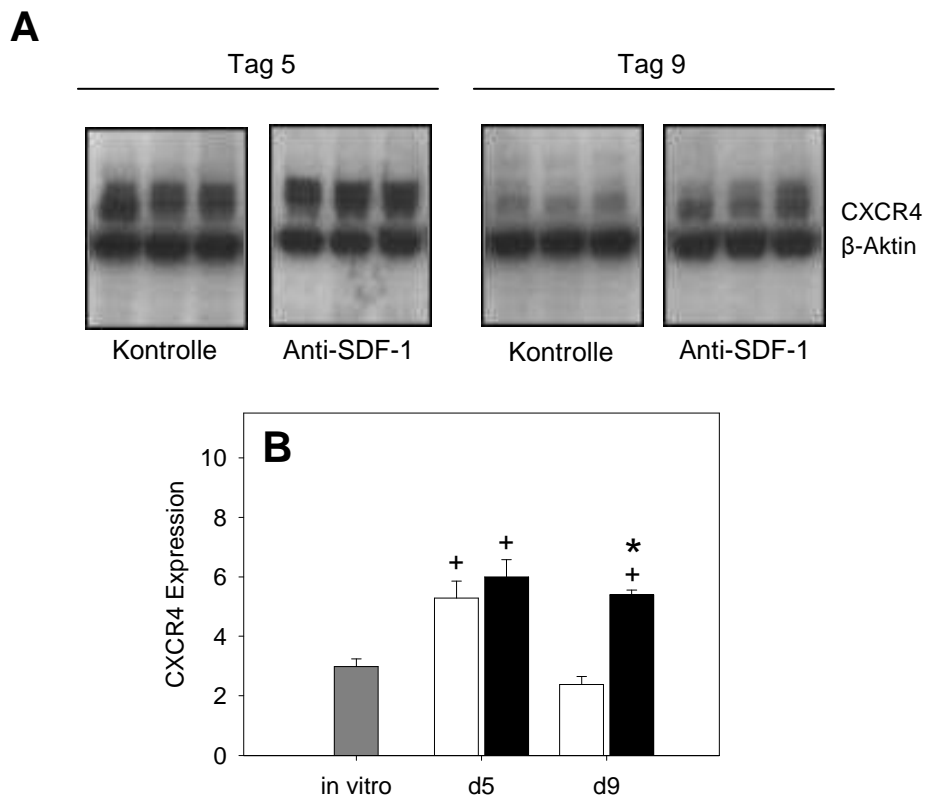


Abbildung 22: Western Blot-Analyse der CXCR4-Expression

Zeitlicher Verlauf der Expression des SDF-1-Rezeptors CXCR4 (A). Die densitometrische Analyse der Banden für CXCR4 im Western Blot (A), zeigte in der Gruppe MAB-0 (schwarzer Balken) eine beständig erhöhte CXCR4-Expression durch die Tumorzellen im Vergleich den CT26.WT-GFP-Zellen *in vitro* (grauer Balken). Unter Kontrollbedingungen (weißer Balken), kam es nach partieller Hepatektomie initial ebenfalls zu einem Anstieg der CXCR4-Expression. Bis zum Tag 9 war dieser Effekt allerdings nicht mehr nachweisbar. Angaben in MW \pm SEM; * $p < 0,05$ vs. Kontrolle; + $p < 0,05$ vs. *in vitro*

5. Diskussion

5.1 Lokale Wirkung von SDF-1 *in vitro* und *in vivo*

Die Ergebnisse der Untersuchungen zur lokalen Wirkung von SDF-1 zeigen, dass das Chemokin SDF-1 die Migration von kolorektalen Tumorzellen *in vitro* dosisabhängig stimuliert und darüber hinaus das Wachstum von kolorektalen Metastasen *in vivo* verstärkt. Interessanterweise beruht dieser Effekt offensichtlich auf einer, von der Tumor-Angiogenese abhängigen, Induktion der Tumorzellproliferation bei gleichzeitiger Hemmung der Tumorzellapoptose.

5.1.1 SDF-1 stimuliert die Tumorzell-Migration und fördert die Metastasierung

Während viele Chemokine an mehr als einen Rezeptor und Chemokinrezeptoren gewöhnlich mehr als ein Chemokin binden, ist SDF-1 der einzige, bisher bekannte Ligand des CXCR4-Rezeptors (Baggiolini M, 1998; Müller A et al., 2001). Die bis vor wenigen Jahren postulierte, monogame Rezeptor-Ligand Bindung von SDF-1 und CXCR4 wurde erst 2006 von Burns und Mitarbeitern durch die Identifikation eines weiteren Rezeptors für SDF-1 widerlegt (Burns JM et al., 2006), welcher gemäß der aktuellen Nomenklatur als CXCR7 bezeichnet wird. Die Bindung von SDF-1 an den membrangebundenen CXCR4-Rezeptor führt zur Internalisierung von CXCR4 sowie zur Mobilisierung von Kalzium und zur Aktivierung der Signalkaskade über die so genannten Mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAPK), zu denen beispielsweise ERK (Extracellular signal-regulated protein kinase)-1 und -2, PI 3 (Phosphatidylinositol-3)-Kinase und die Proteinkinase B (=Akt) gehören (Vlahakis SR et al., 2002). Diese Kinasen sind an der Regulation der Migration, Proliferation und Differenzierung von Zellen beteiligt und darüber hinaus wichtig für deren Überleben (Tilton B et al., 2000).

CXCR4 exprimierende Zellen, wie T-Lymphozyten, Monozyten, hämatopoietische Stammzellen, Endothelzellen und zahlreiche Karzinomzellen reagieren nach Bindung von SDF-1 an seinen Rezeptor mit Chemotaxis. Dieser Effekt ist hauptsächlich G_i-Protein-vermittelt und somit durch Pertussis-Toxin hemmbar (Vlahakis SR et al., 2002). Intrazellulär kommt es hierbei unter anderem zur Aktin-Polymerisierung an dem, der höheren SDF-1-Konzentration zugewandten Zellpol und dadurch zu mikroskopisch nachweisbarer Ausbildung von pseudopodienartigen Zellfortsätzen (Müller A et al., 2001). Die SDF-1-vermittelte Chemotaxis spielt unter anderem eine große Rolle bei der Immunreaktion, der Tumormetastasierung und dem Homing von Stammzellen (McGrath KE et al., 1999; Murdoch C, 2000; Kollet O et al., 2003; Burger JA et al., 2006). Müller und Mitarbeiter wiesen 2001 in einer Studie eine starke Expression des CXCR4-Rezeptors auf primären Mammakarzinomzellen und verschiedenen Tumorzell-Linien nach und fanden außerdem hohe Konzentrationen des CXCR4-Liganden SDF-1 in den primären Zielorganen von Mammakarzinom-Metastasen, wie Lunge, Leber, Lymphknoten und Knochenmark. Sie

schlossen daraus, dass die, durch SDF-1/CXCR4-Interaktion vermittelte Chemotaxis eine Determinante der Organspezifität der Metastasierung CXCR4-exprimierender Tumorzellen darstellt (Müller A et al., 2001). Diese Hypothese wird dadurch gestützt, dass CXCR4 die Interaktion von Tumor- und Endothelzellen durch die Aktivierung des Zell-Rollings, der Integrinfunktion, des Zell-Arrest und der transendothelialen Migration von Tumorzellen unterstützt (Darash-Yahana M et al., 2004; Engl T et al., 2006). Die Exposition gegenüber SDF-1 führt darüber hinaus zu vaskulärer Instabilität durch Zunahme der Gefäßpermeabilität und erleichtert dadurch zusätzlich die Extravasation metastatischer Tumorzellen (Lee BC et al., 2004). Obwohl bisher *in vivo* nicht bewiesen, bestimmt SDF-1 auf diese Weise vermutlich die Lokalisation von Tumorzellen im Gewebe und induziert die Metastasierung durch seinen direkten Einfluss auf die Tumorzellmigration (Balkwill F, 2003; Strieter RM et al., 2004). Anhand einer NSCLC-Zell-Linie wiesen Phillips et al. eine dosisabhängige Migration der Tumorzellen entlang eines SDF-1/CXCR4-Gradienten *in vitro* nach, wobei der Anteil der migrierenden Zellen bei einer SDF-1-Konzentration von 10 ng/ml am größten war (Phillips RJ et al., 2003). In Übereinstimmung mit den Ergebnissen anderer Studien (Brand S et al., 2005; Ottaiano A et al., 2005; Ohira S et al., 2006) zeigte sich in den vorliegenden *in vitro*-Studien ebenfalls ein dosisabhängiger Anstieg der Tumorzellmigration nach Stimulation mit SDF-1. Diese Ergebnisse bestätigen somit erneut den Einfluss von SDF-1 auf die Tumormetastasierung.

5.1.2 SDF-1 steigert metastatisches Tumorwachstum

In vorausgegangenen Studien wurde bereits nachgewiesen, dass eine Überexpression des CXCR4-Rezeptors auf Tumorzellen mit einem verstärkten Tumorwachstum und einem aggressiveren Phänotyp assoziiert ist (Darash-Yahana M et al., 2004; Ottaiano A et al., 2005; Pan J et al., 2006; Zhang L et al., 2007) und dass umgekehrt, die Neutralisation von CXCR4 *in vivo* zu einer Suppression des Tumorwachstums führt (Zeelenberg IS et al., 2003; Guleng B et al., 2005). Diese Daten belegen die funktionelle Beteiligung von SDF-1 während des Tumorwachstums und der Metastasierung, obwohl sie die genaue Funktion von SDF-1 nicht beschreiben können. Aktuell gibt es nur spärliche Informationen über die Funktion von SDF-1 *in vivo*. So konnten Orimo und Mitarbeiter zeigen, dass das Wachstum vom Mammakarzinomzellen *in vivo* durch die Blockade von CXCR4 gehemmt werden kann, wohingegen Phillips et al. nach Neutralisation von SDF-1 keinen Einfluss auf das Tumorwachstum primärer nicht-kleinzelliger Bronchialkarzinome feststellen konnten (Orimo A et al., 2005; Phillips RJ et al., 2003). Neben diesen widersprüchlichen Ergebnissen gibt es keine Informationen darüber, wie sich die direkte SDF-1 Exposition auf das Tumorwachstum *in vivo* auswirkt. Die Ergebnisse der vorliegenden Studie zeigen erstmalig, dass die Applikation von SDF-1 in der Lage ist, das Tumorwachstum *in vivo* zu stimulieren.

Der Mechanismus über den SDF-1 das Wachstum etablierter Tumoren und Metastasen zu fördern vermag, ist bisher noch nicht vollständig entschlüsselt. Einiges spricht dafür, dass das Chemokin sowohl die Zellproliferation als auch den apoptotischen Zelltod beeinflusst. Bezüglich der Aktivierung proliferativer und anti-apoptotischer Signalwege wurde bereits in vorausgegangenen Studien nachgewiesen, dass die Stimulation mit SDF-1 die Signaltransduktion über MAP-Kinasen und Akt induziert und die nukleäre Translokation von Akt und ERK-2 auslöst (Tilton B et al., 2000; Brand S et al., 2005). Darüber hinaus gibt es Hinweise darauf, dass die Bindung von SDF-1 an CXCR4 darüber hinaus auch die Lipidkinase PI3-Kinase aktiviert, die ihrerseits wiederum zur Aktivierung von Akt führt und dadurch die Apoptose von Zellen hemmt und deren Überleben begünstigt (Datta SR et al., 1997; Cardone MH et al., 1998; Kops GJ et al., 1999; Barbero S et al., 2003; Lee BC et al., 2004). Die Aktivierung von ERK1/2 und Akt führen außerdem zur Stimulation der Zell-Proliferation (Datta SR et al., 1997; Barbero S et al., 2003). Obwohl alle diese Studien betreffend die Rolle der SDF-1/CXCR4-Signalkaskade im Rahmen der Zellproliferation und des apoptotischen Zelltodes *in vitro* durchgeführt wurden, wurde in der vorliegenden Studie erstmals gezeigt, dass SDF-1 in der Lage ist, die Tumorzellproliferation auch *in vivo* zu stimulieren, während es gleichzeitig die Tumorzellapoptose hemmt. Dies resultiert in einer Stimulation des Tumorwachstums.

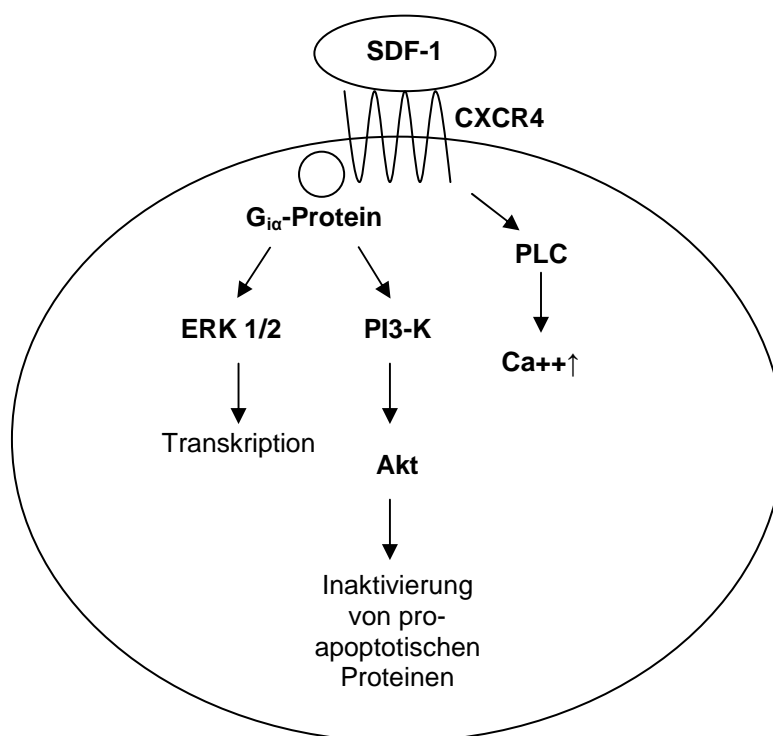


Abbildung 23: Intrazelluläre Signalkaskade nach Bindung von SDF-1 an CXCR4

Die Bindung von SDF-1 an CXCR4 führt zur Aktivierung eines G_i-Proteins und zur Aktivierung der Phospholipase (PL)-C. Dadurch kommt es zur intrazellulären Kalziumfreisetzung, die weitere Signalwege aktiviert und letztlich zur Induktion der Zellmigration führt. Des Weiteren kommt es durch die Aktivierung von PI3-K und Akt zur Inaktivierung pro-apoptotischer Signalwege während die Signaltransduktion über ERK 1/2 die Transkription induziert und dadurch die Zellproliferation stimuliert. Durch diese Signalkaskade kommt es zum einen zur Induktion der Zellmigration CXCR4-expressierender Zellen und zur Stimulation der Proliferation bei gleichzeitiger Hemmung des apoptotischen Zelltodes.

5.1.3 SDF-1 induziert die Tumor-Angiogenese

Die Ausbildung eines funktionellen Kapillarnetzes ist für das Überleben von Tumorzellen im Rahmen des Metastasierungsprozess essentiell (Gimbrone MA et al., 1972; Carmeliet P et al., 2000; Kerbel RS, 2000; Vajkoczy P, 2002). Die Angiogenese im Tumorgewebe wird durch die Verschiebung des Gleichgewichts von pro-angiogenen Faktoren und Angiogenese-Inhibitoren induziert. Die Überexpression pro-angiogener Signale führt zur Ausbildung neuer Blutgefäße, dem „Angiogenic Switch“ (Bergers G et al., 2003).

Obwohl SDF-1, wie bereits einleitend erwähnt, kein ELR+-Chemokin ist, wirkt es via CXCR4 pro-angiogen (Bachelder RE et al., 2002; Salcedo R et al., 2003). So ist die intakte SDF-1/CXCR4-Signalkaskade für die Entwicklung und das Überleben von Mäuseembryonen essentiell, wie anhand eines CXCR4 bzw. SDF-1-Knockout-Modells gezeigt werden konnte. Tiere, die SDF-1 oder CXCR4 nicht exprimieren können, sterben perinatal mit schweren Defekten der Gefäßentwicklung (Tachibana K et al., 1998; Ma Q et al., 1998). Darüber hinaus fanden Darash-Yahana und Mitarbeiter, dass die Anzahl der Blutgefäße in CXCR4-überexprimierenden Prostatakarzinomen um das 4,5fache gesteigert ist und schlussfolgerten daher, dass eine hohe CXCR4-Expression die Tumor-Angiogenese durch eine Steigerung der VEGF-Sekretion stimuliert (Darash-Yahana M et al. 2004). Anhand weiterer Studien wurde die Verbindung zwischen der SDF-1/CXCR4-Signalkaskade und der VEGF-Expression nachgewiesen. So fanden Salcedo et al., dass kultivierte Endothelzellen aus humanen Umbilikalvenen (HUVECs) 24 Stunden nach Stimulation mit SDF-1 eine bis zu 13fach erhöhte VEGF-Produktion aufwiesen (Salcedo R et al., 1999). Ähnliche Resultate erzielten Brand und Mitarbeiter, die zeigten, dass 48 Stunden nach Stimulation der Kolonkarzinom-Zell-Linie HT-29 mit SDF-1, eine signifikante Steigerung der Expression von VEGF mRNA um das 8-fache und von VEGF-Protein um das 5,8-fache nachweisbar war (Brand S et al., 2005). Diese Ergebnisse wurden durch Yang et al. auch anhand von Glioblastom-Zell-Linien bestätigt. Sie konnten nachweisen, dass die Expression von funktionellem CXCR4 mit dem Malignitätsgrad des jeweiligen Phänotyps korreliert und dass die Stimulation mit SDF-1 *in vitro* zur Produktion von VEGF beiträgt (Yang SX et al., 2005). Auch Kryczek et al. zeigten, dass von Ovarialtumoren produziertes SDF-1 in hohen, jedoch nicht pathologisch hohen Konzentrationen zur Gefäßneubildung führte (Kryczek I et al., 2005). Darüber hinaus fanden die Autoren, dass VEGF und SDF-1 die Angiogenese in synergistischer Weise induzieren. Durch Hochregulation des SDF-1-Rezeptors CXCR4 auf Gefäßendothelzellen, unterstützt VEGF indirekt die SDF-1-vermittelte Endothelzell-Migration. Diese Daten deuten darauf hin, dass die Gewebshypoxie, welche zur Ausschüttung von VEGF führt, synergistisch wirkende, angiogene Signalkaskaden induziert, zu denen auch die SDF-1/CXCR4-Kaskade gehört (Kryczek I et al., 2005).

Darüber hinaus konnten Carr und Mitarbeiter zeigen, dass SDF-1 im Aortenring-Assay in Abwesenheit zirkulierender endothelialer Vorläuferzellen die Ausbildung von Gefäßsprossen fördert (Carr AN et al., 2006). Parallel dazu demonstrierten Orimo et al. in einem indirekten Versuchsansatz, dass Karzinom-assoziierte Fibroblasten, welche SDF-1 sezernieren, die Angiogenese durch Rekrutierung von endothelialen Vorläuferzellen fördern. In diesen Experimenten wurde die Bedeutung von SDF-1 für die Angiogenese noch dadurch unterstrichen, dass die Inhibition des CXCR4-Rezeptors die Angiogenese signifikant reduzierte (Orimo A et al., 2005). In der vorliegenden Studie konnte erstmalig in einem direkten Versuchsansatz gezeigt werden, dass die exogene Applikation von SDF-1 tatsächlich die Angiogenese und Vaskularisation von kolorektalen Tumoren *in vivo* beeinflusst. Obwohl SDF-1 insgesamt keine Steigerung der Kapillardichte induzierte, kam es zu einer spezifischen Beschleunigung des Angiogeneseprozesses. Hierbei ist höchstwahrscheinlich auch VEGF involviert, da SDF-1 behandelte Tumoren gegenüber der Kontrollgruppe eine signifikante Vasodilatation zeigten.

Zusammenfassend konnte in diesem ersten Teil der vorliegenden Studie somit gezeigt werden, dass das Chemokin SDF-1 das Wachstum solider Tumormetastasen durch Steigerung der Tumorzellproliferation und Hemmung der Tumorzellapoptose fördert. Darüber hinaus wird die Tumorangiogenese nachhaltig beeinflusst.

5.2 Auswirkung der SDF-1-Blockade auf kolorektale Metastasen nach Leberresektion

Aufgrund des besonderen Stellenwertes von SDF-1 bei der Tumorentwicklung wurden im zweiten Teil der Vorliegenden Studie die Auswirkungen der SDF-1-Blockade auf Tumorwachstum und Angiogenese extrahepatischer kolorektaler Metastasen nach Leberresektion untersucht. Das wichtigste Ergebnis dieser Studie ist, dass die Blockade von endogenem SDF-1 nicht zur Inhibition, sondern sogar zu einer Stimulation des Tumorwachstums und der Tumorzellinfiltration führt. In den hierzu durchgeführten Versuchsreihen kam es, nach einer initialen Verzögerung des Anwachsens der Tumorzellen unter SDF-1-Blockade, in der späteren Wachstumsphase zu einer Beschleunigung des Tumorwachstums, welche am wahrscheinlichsten durch eine VEGF-vermittelte Stimulation der Tumorangiogenese und eine Hemmung des apoptotischen Zelltodes vermittelt ist.

5.2.1 Die Blockade von SDF-1 führt zur Aktivierung einer alternativen Signalkaskade

Während in der vorliegenden Studie der Effekt der Leberresektion auf die Wirkung von SDF-1 untersucht wurde, zeigte sich in weiterführenden Versuchen, dass die Blockade von SDF-1 nach Leberresektion sich ähnlich auf das Tumorwachstum auswirkte wie die Neutralisation von SDF-1 ohne vorherige Resektion. Diese Ergebnisse zeigen, dass die Leberresektion nicht zu einer spezifischen Stimulation der Wirkung von SDF-1 führt und stehen somit in

Einklang mit den Ergebnissen von Mavrier und Mitarbeitern, die demonstrierten, dass eine 2/3 Leberresektion die SDF-1 Expression im Vergleich zur normalen Kontroll-Leber nicht beeinflusst (Mavrier P et al., 2004).

Demgegenüber stehen die hier vorgestellten Ergebnisse anscheinend im Widerspruch zu den Resultaten vorausgegangener Studien, in welchen eine Inhibition des lokalen Tumorwachstums und der Angiogenese nach Blockade des SDF-1/CXCR4 Signalweges durch die Neutralisation des SDF-1-Rezeptors CXCR4, nachgewiesen werden konnte. So fanden Darash-Yahana und Mitarbeiter nach Applikation eines Anti-CXCR4-Antikörpers eine Reduktion von Tumorwachstum und Vaskularisation CXCR4-überexprimierender Prostatakarzinome, welche in die Flanke von SCID-Mäusen implantiert worden waren (Darash-Yahana M et al., 2004). Zu ähnlichen Ergebnissen kamen auch Guleng et al. nach subkutaner Implantation von Kolon- und Pankreaskarzinomzellen. In diesem Versuchsansatz wurden Tumorwachstum und Angiogenese *in vivo* durch Neutralisation von CXCR4 supprimiert (Guleng B et al., 2005). Im Gegensatz dazu konnten Phillips et al. nach Applikation eines neutralisierenden Anti-SDF-1 Antikörpers nur eine Reduktion der metastatischen Aussaat, aber nicht der Tumorgöße und Vaskularisierung von Nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinomen in SCID-Mäusen feststellen (Phillips RJ et al., 2003).

Aufgrund dieser Diskrepanzen ist es demnach wichtig, sorgfältig zwischen der Blockade des CXCR4-Rezeptors und der Blockade seines Liganden SDF-1 zu differenzieren. Es ist allerdings unwahrscheinlich, dass die CXCR4-vermittelte Signalkaskade in Abwesenheit von SDF-1 aufrechterhalten werden kann, da aktuell keine weiteren Liganden bekannt sind, die durch CXCR4 agieren. Obwohl nicht ausgeschlossen werden kann, dass weitere Liganden für CXCR4 existieren, kann das persistierende Tumorwachstum nach SDF-1-Blockade noch durch einen weiteren Mechanismus erklärt werden.

In Studien jüngerer Datums wurde mit CXCR7 ein weiterer Chemokin-Rezeptor identifiziert, welcher neben SDF-1 auch Interferon-inducible T-cell alpha chemoattractant (I-TAC) bindet (Burns JM et al., 2006). I-TAC wird konstitutiv in verschiedenen Geweben exprimiert, darunter Leber, Lymphknoten, Milz, Thymus, Niere und Gehirn (Meyer M et al., 2001). Neben CXCR7 bindet I-TAC auch an den CXCR3-Rezeptor und wirkt darüber ausgeprägt chemotaktisch auf CXCR3+ T-Lymphozyten (Meyer M et al., 2001). Dieser Mechanismus resultiert in einer starken Suppression des Wachstums maligner Tumoren *in vivo*, welche mit der Rekrutierung von CD8+ T-Lymphozyten in die Tumoren einhergeht (Hensbergen PJ et al., 2005). Anhand eines *in vitro*-Modells, konnten Romagnani und Mitarbeiter zeigen, dass der durch I-TAC und CXCR3 vermittelte Signalweg durch Inhibition der Endothelzell-Proliferation angiostatisch wirkt. Dieser Effekt konnte durch Verabreichung eines Anti-CXCR3-Antikörpers blockiert werden (Romagnani P et al., 2001). Die angiostatische Wirkung der I-TAC/CXCR3-Achse konnte in einem *in vivo* Versuchsansatz ebenfalls bestätigt werden, in dem die Applikation von I-TAC die angiogene Aktivität von IL-8

inhibierte. Dieser Effekt war wiederum durch einen Anti-CXCR3-Antikörper hemmbar (Burdick MD et al., 2005).

Im Gegensatz zu der angiostatischen I-TAC/CXCR3-Achse ist die Signalkaskade durch CXCR7 höchstwahrscheinlich angiogen. So fanden Miao eine konstante Expression von CXCR7 im Gefäßnetz von Mamma- und Bronchialkarzinomen, während der Rezeptor in den Blutgefäßen des normalen Mammagewebes kaum nachweisbar war (Miao Z et al., 2007). Weiterhin führte ein CXCR7-Knockout bei Zebrafischen zur Ausbildung eines Ähnlichen Phänotyps wie nach VEGFR-Knockout mit Dilatation des Perikards und schweren Gefäßmissbildungen (Miao Z et al., 2007). In Übereinstimmung hierzu fanden Burns et al., dass die Tumoren, die SCID-Mäuse nach intraperitonealer Injektion von humanen B-Zell-Lymphomzellen entwickelten, nach Behandlung mit einem Anti-CXCR7-Antikörper nur wenig organisiert und kaum vaskularisiert waren (Burns JM et al., 2006). Zusätzlich zeigen Wang und Mitarbeiter, dass die Überexpression von CXCR7 die Expression von potenten angiogenen Faktoren, wie IL-8 und VEGF signifikant steigert und die Formation von Blutgefäßsprossen durch humane Endothelzellen dramatisch stimuliert (Wang J et al., 2008). In der vorliegenden Studien kam es zu einem deutlichen Anstieg der VEGF-Expression im Tumorgewebe unter kontinuierlicher Blockade von SDF-1. Dies war unerwartet, da in der Vergangenheit bereits gezeigt wurde, dass die Exposition mit SDF-1 selbst eine Steigerung der VEGF-Expression in Glioblastom- und kolorektalen Tumorzell-Linien induziert (Brand S et al., 2005; Yang SX et al., 2005; Ottaviano A, 2005). Aufgrund dessen muss der Anstieg der VEGF-Expression in der vorliegenden Studie die Folge der Aktivierung eines alternativen Signalwegs sein. Da die Signalkaskade über den kürzlich entdeckten CXCR7-Rezeptor auch zu einer Induktion der VEGF-Expression führt, ist deren Anstieg unter kontinuierlicher SDF-1-Blockade höchstwahrscheinlich auf die Aktivierung einer alternativen Signalkaskade, in welche I-TAC und CXCR7 involviert sind, zurückzuführen.

Es ist bekannt, dass das Einsetzen der Tumorangiogenese, zu dem es im Rahmen der Tumorprogression kommt, auf einer Imbalance zwischen pro- und anti-angiogenen Signalen zugunsten der pro-angiogenen Seite beruht (Bergers G et al., 2003). Es ist wahrscheinlich, dass die Chemokin-assoziierten Signalkaskaden, bestehend aus den Chemokinen SDF-1 und I-TAC sowie deren Rezeptoren CXCR3, CXCR4 und CXCR7 unter physiologischen Bedingungen ein Gleichgewicht zwischen Angiogenese und Angiostase bilden. Dabei binden SDF-1 und I-TAC wahrscheinlich beide an CXCR7 und wirken pro-angiogen. Im Gleichgewichtszustand wird dieser Mechanismus durch die angiostatisch wirkende Signalkaskade via I-TAC und CXCR3 ausgeglichen. Eine Störung dieses Gleichgewichts führt somit entweder zur Bevorzugung des angiogenen, CXCR4- und CXCR7-vermittelten, oder des angiostatischen, CXCR3-vermittelten Signalweges. Nach Blockade von SDF-1 kann I-TAC in höherem Maße an CXCR7 binden und wird dadurch aus der CXCR3-Bindung abgezogen. In diesem Fall kommt es zum Überwiegen des pro-angiogenen, CXCR7-

abhängigen Signalweges, woraus eine Verstärkung der Angiogenese resultiert. Die starke Stimulation von Angiogenese und Vaskularisierung mit einem früheren Einsetzen der Ausbildung von Gefäßsprossen nach SDF-1-Blockade, wie sie in der vorliegenden Studie beobachtet wurde, kann somit der Aktivierung der pro-angiogenen, CXCR7-abhängigen Signalkaskade, bei gleichzeitiger relativer Inhibition der angiostatischen, CXCR3-abhängigen Signalkaskade zugeschrieben werden. Bekanntlich ist die Tumervaskularisation zur Aufrechterhaltung der Sauerstoff- und Nährstoffversorgung sowie zum Abtransport von Stoffwechselendprodukten essentiell (Carmeliet P, 2000; Bergers G et al., 2003), wodurch die Beschleunigung des Tumorwachstums in der späteren Phase der vorliegenden Studie erklärt wird.

5.2.2 Die Blockade von SDF-1 begünstigt invasives Tumorwachstum

Als einer der bedeutendsten angiogenen Faktoren trägt VEGF zur Steigerung der Gefäßpermeabilität bei, was wiederum die Disseminierung von Endothelzellen und malignen Tumorzellen begünstigt (Plate KH et al., 1992; Hippenstiel S et al., 1998; Carmeliet P, 2000). Daher determiniert VEGF neben seinem angiogenen Effekt auch die Tumor-Invasivität (Wang S et al., 2008; Kanda M et al., 2008). Daher ist die Verstärkung der Tumordinvasion in das darunter liegende Wirtsgewebe der Rückenhautkammer, wie es in der vorliegenden Studie beobachtet wurde, möglicherweise auf die erhöhte VEGF-Expression zurückzuführen. Da sowohl eine ausgeprägte angiogene Aktivität, als auch eine starke Tumorzell-Invasion Kennzeichen eines aggressiven Tumorwachstums sind, stellt die Verlagerung von der CXCR4- auf die CXCR7-vermittelte Signaltransduktion möglicherweise einen kritischen Schritt im Rahmen der Tumourprogression dar. Interessanterweise wird CXCR7 nur selten auf normalem adultem Gewebe exprimiert, während maligne transformierte Gewebe, verschiedene Tumorzell-Linien und embryonale Gewebe CXCR7 auf ihrer Oberfläche exprimieren (Burns JM et al., 2006; Miao Z et al., 2007). Dementsprechend wurde CXCR7 in der vorliegenden Studie auf der Zelloberfläche von ~65% der verwendeten CT26.WT-Tumorzellen nachgewiesen. Das Expressionsmuster dieses Rezeptors lässt daher auf eine entscheidende Bedeutung von CXCR7 im Rahmen der Embryonalentwicklung und auf eine Reaktivierung der Rezeptorexpression bei der malignen Transformation von Geweben schließen. Bei CXCR7 exprimierenden Zellen führt die Signalkaskade über diesen Rezeptor zur Verbesserung des Überlebens der Zelle, insbesondere unter suboptimalen Kulturbedingungen. Dabei kommt es nicht zu einer Zunahme der Zellproliferation, sondern vielmehr zu einer Hemmung des apoptotischen Zelltodes (Burns JM et al., 2006). Entsprechend konnte in der vorliegenden Studie eine signifikante Reduktion des apoptotischen Zelltodes in den Anti-SDF-1 behandelten Tumoren 14 Tage nach Tumorzell-Implantation festgestellt werden, während die Tumorzellproliferation unbeeinträchtigt blieb. Diese Beobachtung unterstützt daher die hier aufgestellte Hypothese, dass es unter

kontinuierlicher SDF-1-Blockade zu einer Aktivierung eines I-TAC/CXCR7-abhängigen Signalwegs kommt. Die, im Vergleich zu kultivierten CT26.WT-Zellen, niedrigere Proliferationsrate der Tumorzellen *in vivo*, lässt sich auf den Anteil der Stromazellen im Tumorgewebe bei soliden Metastasen zurückführen.

5.2.3 Die Blockade von SDF-1 führt zur Steigerung der CXCR4-Expression

Bezüglich der CXCR4-Expression wurde bereits von Tilton und Mitarbeitern berichtet, dass die Bindung von SDF-1 an CXCR4 zu einer Internalisierung des Rezeptors führt (Tilton B et al., 2001). Aus diesem Grund ist es wahrscheinlich, dass die Neutralisation von SDF-1 umgekehrt zu einer Erhöhung der Oberflächenexpression von CXCR4 führt. Da es in der vorgestellten Studie entsprechend zu einem signifikanten Anstieg der Oberflächenexpression von CXCR4 kam, muss die Blockade von SDF-1 durch den neutralisierenden Antikörper in diesem Versuchsansatz als effektiv betrachtet werden.

5.2.4 Einfluss der SDF-1-Blockade auf etablierte Metastasen

Die Applikation des Anti-SDF-1-Antikörpers ab dem Tag der Tumorzellimplantation wurde gewählt, um den Einfluss des Chemokins auf das Anwachsen der Tumorzellen zu untersuchen. Um zusätzlich die Effekte auf das Wachstum etablierter Metastasen zu untersuchen, wurden zusätzlich Tiere ab dem 5. Tag nach Tumorzellimplantation mit dem Antikörper behandelt. In diesem Fall fanden sich vergleichbare Auswirkungen der SDF-1-Blockade auf Tumorwachstum und apoptotischen Zelltod. Im Unterschied zu den Effekten der Blockade von SDF-1 ab dem Tag der Tumorzell-Implantation, waren die Auswirkungen auf die Tumorangiogenese hierbei weniger ausgeprägt und die Tumor-Invasivität war im Vergleich zur Kontrollgruppe nicht verändert. Daraus lässt sich ableiten, dass die I-TAC/CXCR7-vermittelte Steigerung der angiogenen Aktivität und Invasivität der Tumorzellen vor allem im Rahmen des Anwachsens der Tumorzellen von entscheidender Bedeutung ist.

5.3 Schlussfolgerung

Die Ergebnisse der vorliegenden Studie zeigen, dass das Chemokin SDF-1 im Rahmen der Entstehung von Metastasen des kolorektalen Karzinoms von entscheidender Bedeutung ist. Durch die SDF-1-vermittelte Stimulation der Tumorzellproliferation und Angiogenese, wird das Wachstum von metastatischen Tumorzellen in Organen mit hoher SDF-1-Konzentration begünstigt. Allerdings wird das, nach Leberresektion stimulierte, Metastasenwachstum durch Neutralisation von SDF-1 nicht dauerhaft gehemmt. Die vorliegende Arbeit konnte zeigen, dass es besonders unter SDF-1-Blockade in der Frühphase der Metastasenentstehung zu einer Stimulation der Tumorangiogenese und zur Ausbildung eines aggressiveren Wachstumsmusters der Tumorzellen kommt, welche am wahrscheinlichsten durch die Aktivierung einer I-TAC/CXCR7-vermittelten Signalkaskade bedingt ist. Aus diesem Grund sollte CXCR7 als neues Target zur Vermeidung der Metastasierung des kolorektalen Karzinoms weiter untersucht werden, damit die gewonnenen Erkenntnisse um die funktionelle Bedeutung von SDF-1 bei der Metastasierung therapeutisch nutzbar gemacht werden können.

6. Literaturverzeichnis

1. Abdalla EK, Vauthey JN, Ellis LM, Ellis V, Pollock R, Broglio KR, Hess K, Curley SA. Recurrence and outcomes following hepatic resection, radiofrequency ablation, and combined resection/ablation for colorectal liver metastases. *Ann Surg* 2004;239:818-827.
2. Bachelder RE, Wendt MA, Mercurio AM. Vascular endothelial growth factor promotes breast carcinoma invasion in an autocrine manner by regulating the chemokine receptor CXCR4. *Cancer Res* 2002;62:7203-7206.
3. Baggiolini M. Chemokines and leukocyte traffic. *Nature* 1998;392:565-568.
4. Balkwill F. Chemokine biology in cancer. *Sem Immunol* 2003;15:49-55.
5. Barbero S, Bonavia R, Bajetto A, Porcile C, Pirani P, Ravetti JL, Zona GL, Spaziante R, Florio T, Schettini G. Stromal cell-derived factor 1alpha stimulates human glioblastoma cell growth through the activation of both extracellular signal-regulated kinases 1/2 and Akt. *Cancer Res* 2003;63:1969-1974.
6. Bergers G, Benjamin LE. Tumorigenesis and the angiogenic switch. *Nature Rev Cancer* 2003;3:401-410.
7. Brand S, Dambacher J, Beigel F, Olszak T, Diebold J, Otte JM, Goke B, Eichhorst ST. CXCR4 and CXCL12 are inversely expressed in colorectal cancer cells and modulate cancer cell migration, invasion and MMP-9 activation. *Exp Cell Res* 2005;15;310:117-130.
8. Burdick MD, Murray LA, Keane MP, Xue YY, Zisman DA, Belperio JA, Strieter RM. CXCL11 attenuates bleomycin-induced pulmonary fibrosis via inhibition of vascular remodeling. *Am J Respir Crit Care Med* 2005;171:261-268.
9. Burger JA, Kipps TJ. CXCR4: a key receptor in the crosstalk between tumor cells and their microenvironment. *Blood* 2006; 107:1761-1767.
10. Burns JM, Summers BC, Wang Y, Melikian A, Berahovich R, Miao Z, Penfold MET, Sunshine MJ, Littman DR, Kuo CJ, Wei K, McMaster BE, Wright K, Howard MC, Schall TJ. A novel chemokine receptor for SDF-1 and I-TAC involved in cell survival, cell adhesion, and tumor development. *J Exp Med* 2006;203:2201-2213.
11. Cardone MH, Roy N, Stennicke HR, Salvesen GS, Franke TF, Stanbridge E, Frisch S, Reed JC. Regulation of cell death protease caspase-9 by phosphorylation. *Science* 1998;282:1318-1321.
12. Carmeliet P, Jain RK. Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature* 2000;407:249-257.

13. Carr AN, Howard BW, Yang HT, Eby-Wilkens E, Loos P, Varbanov A, Qu A, DeMuth JP, Davis MG, Proia A, Terjung RL, Peters KG. Efficacy of systemic administration of SDF-1 in a model of vascular insufficiency: support for an endothelium-dependent mechanism. *Cardiovasc Res* 2006;69:925-935.
14. Castillo MH, Doerr RJ, Paolini N, Cohen S, Goldrosen M. Hepatectomy prolongs survival of mice with induced liver metastases. *Arch Surg* 1989;124:167-169.
15. Chambers AF, Groom AC, MacDonald IC. Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites. *Nat Rev Cancer* 2002;2:563-572.
16. Chambers AF, MacDonald IC, Schmidt EE, Morris VL, Groom AC. Preclinical assessment of anti-cancer therapeutic strategies using *in vivo* videomicroscopy. *Cancer Metast Rev* 1998/99;17:263-269.
17. Chambers AF, Matrisian LM. Changing views of the role of matrix metalloproteinases in metastasis. *J Natl Cancer Inst* 1997;89:1260-1270.
18. Chang YC. Low mortality major hepatectomy. *Hepatogastroenterology* 2004;51:1766-1770.
19. Dalakas E, Newsome PN, Harrison DJ, Plevris JN. Hematopoietic stem cell trafficking in liver injury. *FASEB J* 2005;19:1225-1231.
20. Darash-Yahana M, Pikarsky E, Abramovitch R, Zeira E, Pal B, Karplus R, Beider K, Avniel S, Kasem S, Galun E, Peled A. Role of high expression levels of CXCR4 in tumor growth, vascularization, and metastasis. *FASEB J* 2004;18:1240-1242.
21. Datta SR, Dudek H, Tao X, Masters S, Fu H, Gotoh Y, Greenberg ME. Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. *Cell* 1997;91:231-241.
22. DeJong KP, Lont HE, Bijma AM, Brouwers MA, de Vries EG, van Veen ML, Marquet RL, Slooff MJ, Terpstra OT. The effect of partial hepatectomy on tumor growth in rats: *in vivo* and *in vitro* studies. *Hepatology* 1995;22:1263-1272 .
23. Dias S, Choy M, Rafii S. The role of CXC chemokines in the regulation of tumor angiogenesis. *Cancer Invest* 2001;19:732-738.
24. Diel IJ, Solomayer EF, Bastert G. Bisphosphonates and the prevention of metastasis: first evidences from preclinical and clinical studies. *Cancer* 2000;88:3080-3088.
25. Doerr R, Castillo M, Evans P, Paolini N, Goldrosen M, Cohen SA. Partial hepatectomy augments the liver's antitumor response. *Arch Surg* 1989;124:170-174.
26. Drixler TA, Borel Rinkes IHM, Ritchie ED, van Vroonhoven TJMV, Gebbink MFBG, Voest EE. Continuous administration of angiostatin inhibits accelerated growth of colorectal liver metastases after partial hepatectomy. *Cancer Res* 2000;60:1761-1765.

27. Drixler TA, Vogten MJ, Ritchie ED, van Vroonhoven TJMV, Gebbink MFBG, Voest EE, Borel Rinkes IHM. Liver regeneration is an angiogenesis-associated phenomenon. *Ann Surg* 2002;236:703-712.
28. Engl T, Engl T, Relja B, Marian D, Blumenberg C, Müller I, Beecken WD, Jones J, Ringel EM, Bereiter-Hahn J, Jonas D, Blaheta RA. CXCR4 chemokine receptor mediates prostate tumor cell adhesion through alpha5 and beta3 integrins. *Neoplasia* 2006;8:290-301.
29. Fisher B, Fisher ER. Experimental studies of factors influencing hepatic metastases: II. Effect of partial hepatectomy. *Cancer* 1959;12:929-932.
30. Fong Y, Fortner J, Sin RL, Brennan MF, Blumgart LH. Clinical score for predicting recurrence after hepatic resection for metastatic colorectal cancer: analysis of 1001 consecutive cases. *Ann Surg* 1999;230:309-318.
31. Fong Y. Surgical therapy of hepatic colorectal metastasis. *CA Cancer J Clin* 1999;49:231-255.
32. Fukumura D, Yuan F, Monsky WL, Chen Y, Jain RK: Effect of host microenvironment on the microcirculation of human colon adenocarcinoma. *Am J Pathol* 1997; 151:679-688.
33. Gehling UM, Willems M, Dandri M, Petersen J, Berna M, Thill M, Wulf T, Müller L, Pollok JM, Schlagner K, Faltz C, Hossfeld DK, Rogiers X. Partial hepatectomy induces mobilization of a unique population of haematopoietic progenitor cells in human healthy liver donors. *J Hepatol* 2005;43:845-853.
34. Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. in Zusammenarbeit mit dem Robert-Koch-Institut. Krebs in Deutschland - Häufigkeiten und Trends. Überarbeitete Auflage, Saarbrücken 2006.
35. Gimbrone MA, Leapman SB, Cotran RS, Folkman J. Tumor dormancy in vivo by prevention of neovascularization. *J Exp Med* 1972;136:261-276.
36. Guba M, Cernaianu G, Koehl G, Geissler EK, Jauch K-W, Anthuber M, Falk W, Steinbauer M. A primary tumor promotes dormancy of solitary tumor cells before inhibiting angiogenesis. *Cancer Res* 2001;61:5575-5579.
37. Guleng B, Tateishi K, Ohta M, Kanai F, Jazag A, Ijichi H, Tanaka Y, Washida M, Morikane K, Fukushima Y, Yamori T, Tsuruo T, Kawabe T, Miyagishi M, Taira K, Sata M, Omata M. Blockade of the stromal cell-derived factor-1/CXCR4 axis attenuates in vivo tumor growth by inhibiting angiogenesis in a vascular endothelial growth factor-independent manner. *Cancer Res* 2005;65:5864-5871.
38. Harun N, Nikfarjam M, Muralidharan V, Christophi C. Liver regeneration stimulates tumor metastases. *J Surg Res.* 2007;138:284-290.

39. Helbig G, Christopherson II KW, Bhat-Nakshatri P, Kumar S, Kishimoto H, Miller KD, Broxmeyer HE, Nakshatri H: NF- κ B promotes breast cancer cell migration and metastasis by inducing the expression of the chemokine receptor CXCR4. *J Biol Chem* 2003;278:21631-21638.
40. Hensbergen PJ, Wijnands PGJTB, Schreurs MWJ, Scheper RJ, Willemze R, Tensen CP. The CXCR3 targeting chemokine CXCL11 has potent antitumor activity in vivo involving attraction of CD8⁺ T lymphocytes but not inhibition of angiogenesis. *J Immunother* 2005; 28: 343-351.
41. Hippenstiel S, Krull M, Ikemann A, Risau W, Clauss M, Suttrop N. VEGF induces hyperpermeability by a direct action on endothelial cells. *Am J Physiol* 1998;274:L678-L684.
42. Homey B, Müller A, Zlotnik A. Chemokines: agents for the immunotherapy of cancer? *Nature Rev Immunol* 2002;2:175-184.
43. Houshmand P, Zlotnik A. Therapeutic applications in the chemokine superfamily. *Current Op Chem Biol* 2003;7:457-460.
44. Hurwitz H, Fehrenbacher L, Novotny W, Cartwright T, Hainsworth J, Heim W, Berlin J, Baron A, Griffing S, Holmgren E, Ferrara N, Fyfe G, Rogers B, Ross R, Kabbinavar F. Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med* 2004;350:2335-2342.
45. Imamura H, Seyama Y, Kokudo N, Maema A, Sugawara Y, Sano K, Takayama T, Makuuchi M. One thousand fifty-six hepatectomies without mortality in 8 years. *Arch Surg* 2003;138:1198-1206.
46. Jain RK, Munn LL, Fukumuma D. Dissecting tumor pathophysiology using intravital microscopy. *Nature Rev Cancer* 2002;2:266-276.
47. Jarnagin WR, Gonen M, Fong Y, DeMatteo RP, Ben-Porat L, Little S, Corvera C, Weber S, Blumgart LH. Improvement in perioperative outcome after hepatic resection: analysis of 1,803 consecutive cases over the past decade. *Ann Surg* 2002;236:397-406.
48. Jordan NJ, Kolios G, Abbot SE, Sinai MA, Thompson DA, Petraki K, Westwick J. Expression of functional CXCR4 chemokine receptors on human colonic epithelial cells. *J Clin Invest* 1999;104:1061-1069.
49. Kabbinavar FF, Schulz J, McCleod M, Patel T, Hamm JT, Hecht JR, Mass R, Perrou B, Nelson B, Novotny WF. Addition of bevacizumab to bolus fluorouracil and leucovorin in first-line metastatic colorectal cancer: results of a randomized phase II trial. *J Clin Oncol* 2005;23:3697-3705.

50. Kanda M, Nomoto S, Nishikawa Y, Sugimoto H, Kanazumi N, Takeda S, Nakao A. Correlations of the expression of vascular endothelial growth factor B and its isoforms in hepatocellular carcinoma with clinico-pathological parameters. *J Surg Oncol*. 2008;98:190-196.
51. Kang H, Watkins G, Parr C, Douglas-Jones A, Mansel RE, Jiang WG. Stromal cell derived factor-1: its influence on invasiveness and migration of breast cancer cells in vitro, and its association with prognosis and survival in human breast cancer. *Breast Cancer Res* 2005;7:402-410.
52. Kassis J, Lauffenburger DA, Turner T, Wells A. Tumor invasion as dysregulated cell motility. *Semin Cancer Biol* 2001;11:105-117.
53. Kerbel RS. Tumor angiogenesis: past, present and the near future. *Carcinogenesis* 2000;21:505-515.
54. Kollet O, Shvitiel S, Chen YQ, Suriawinata J, Thung SN, Dabeva MD, Kahn J, Spiegel A, Dar A, Samira S, Goichberg P, Kalinkovich A, Arenzana-Seisdedos F, Nagler A, Hardan I, Revel M, Shafritz DA, Lapidot T. HGF, SDF-1 and MMP-9 are involved in stress-induced human CD34⁺ stem cell recruitment to the liver. *J Clin Invest* 2003;112:160-169.
55. Kollmar O, Menger MD, Schilling MK. Macrophage inflammatory protein-2 contributes to liver resection-induced acceleration of hepatic metastatic tumor growth. *World J Gastroenterol* 2006;12:858-867.
56. Kollmar O, Schilling MK, Menger MD. Experimental liver metastasis: standards for local cell implantation to study isolated tumor growth in mice. *Clin Exp Metastasis* 2004;21:453-460.
57. Kops GJ, de Ruiter ND, De Vries-Smits AM, Powell DR, Bos JL, Burgering BM. Direct control of the forkhead transcription factor AFX by protein kinase B. *Nature* 1999;398:630-634.
58. Koshiba T, Hosotani R, Miyamoto Y, Ida J, Tsuji S, Nakajima S, Kawaguchi M, Kobayashi H, Doi R, Hori T, Fujii N, Imamura M. Expression of stromal cell-derived factor 1 and CXCR4 ligand receptor system in pancreatic cancer: a possible role for tumor progression. *Clin Cancer Res* 2000;6:3530-3535.
59. Kryczek I, Lange A, Mottram P, Alvarez X, Cheng P, Hogan M, Moons L, Wei S, Zou L, Machelon V, Emilie D, Terrassa M, Lackner A, Curiel TJ, Carmeliet P, Zou W. CXCL12 and vascular endothelial growth factor synergistically induce neoangiogenesis in human ovarian cancers. *Cancer Res* 2005;65:465-472.
60. Lee BC, Lee TH, Avraham S, Avraham HK. Involvement of the chemokine receptor CXCR4 and its ligand stromal cell-derived factor 1 α in breast cancer cell migration through human brain microvascular endothelial cells. *Mol Cancer Res* 2004;2:327-338.

61. Li CY, Shan S, Huang Q, Braun RD, Lanzen J, Hu K, Lin P, Dewhirst MW. Initial stages of tumor cell-induced angiogenesis: evaluation via skin window chambers in rodent models. *J Natl Cancer Inst* 2000;92:143-147.
62. Luzzi KJ, MacDonald IC, Schmidt EE, Kerkvliet N, Morris VL, Chambers AF, Groom AC. Multistep nature of metastatic inefficiency: dormancy of solitary cells after successful extravasation and limited survival of early micrometastases. *Am J Pathol* 1998;153:865-873.
63. Ma Q, Jones D, Borghesani PR, Segal RA, Nagasawa T, Kishimoto T, Bronson RT, Springer TA. Impaired B-lymphopoiesis, myelopoiesis, and derailed cerebellar neuron migration in CXCR4- and SDF-1-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:9448-9453.
64. Mavrier P, Martin N, Couchie D, Préaux A-M, Laperche Y, Zafrani ES. Expression of stromal cell-derived factor-1 and of its receptor CXCR4 in liver regeneration from oval cells in rat. *Am J Pathol* 2004;165:1969-1977.
65. Maxwell PH, Pugh CW, Ratcliffe PJ. Activation of the HIF pathway in cancer. *Curr Opin Genet Dev* 2001;11:293-309.
66. McDonnell S, Chaudhry V, Mansilla-Soto J, Zeng ZS, Shu WP, Guillem JG. Metastatic and non-metastatic colorectal cancer (CRC) cells induce host metalloproteinase production in vivo. *Clin Exp Metast* 1999;17:341-349.
67. McGrath KE, Koniski AD, Maltby KM, McGann JK, Palis J. Embryonic expression and function of the chemokine SDF-1 and its receptor, CXCR4. *Dev Biol* 1999;213:442-456.
68. Menger MD, Laschke MW, Amon M, Schramm R, Thorlacius H, Rücker M, Vollmar B. Experimental models to study microcirculatory dysfunction in muscle ischemia-reperfusion and osteomyocutaneous flap transfer. *Langenbecks Arch Surg* 2003;388:281-290.
69. Menger MD, Laschke MW, Vollmar B. Viewing the microcirculation through the window: some twenty years experience with the hamster dorsal skinfold chamber. *Eur Surg Res* 2002;34:83-91.
70. Meyer M, Hensbergen PJ, van der Raaij-Helmer EM, Brandacher G, Margreiter R, Heufler C, Koch F, Narumi S, Werner ER, Colvin R, Luster AD, Tensen CP, Werner-Felmayer G. Cross reactivity of three T cell attracting murine chemokines stimulating the CXC chemokine receptor CXCR3 and their induction in cultured cells and during allograft rejection. *Eur J Immunol.* 2001;31:2521-2527.
71. Miao Z, Luker KE, Summers BC, Berahovich R, Bhojani MS, Rehemtulla A, Kleer CG, Essner JJ, Nasevicius A, Luker GD, Howard MC, Schall TJ. CXCR7 (RDC1) promotes breast and lung tumor growth in vivo and is expressed on tumor-associated vasculature. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007;104:15735-15740.

72. Michalopoulos GK, DeFrances MC. Liver regeneration. *Science* 1997;276:60-66.
73. Mizutani J, Hiraoka T, Yamashita R, Miyauchi Y. Promotion of hepatic metastases by liver resection in the rat. *Br J Cancer* 1992;65:794-797.
74. Moore BB, Arenberg DA, Addison CL, Keane MP, Polverini PJ, Strieter RM. CXC chemokines mechanism of action in regulating tumor angiogenesis. *Angiogenesis* 1998;2:123-134.
75. Moore MAS. The role of chemoattraction in cancer metastases. *BioEssays* 2001;23:674-676.
76. Morris VL, MacDonald IC, Koop S, Schmidt EE, Chambers AF, Groom AC. Early interactions of cancer cells with the microvasculature in mouse liver and muscle during hematogenous metastasis: videomicroscopic analysis. *Clin Exp Metast* 1993;11:377-390.
77. Morris VL, Schmitt EE, MacDonald IC, Groom AC, Chambers AF. Sequential steps in hematogenous metastasis of cancer cells studied by *in vivo* videomicroscopy. *Invasion Metast* 1997;17:281-296.
78. Mueller MM, Fusenig NE. Friends or foes – bipolar effects of the tumour stroma in cancer. *Nature Rev Cancer* 2004; 4:839-849.
79. Müller A, Homey B, Soto H, Ge N, Catron D, Buchanan M, McClanahan T, Murphy E, Yuan W, Wagner SN, Barrera JL, Mohar A, Verástegui E, Zlotnik A. Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis. *Nature* 2001;410:50-56.
80. Murdoch C, Monk PN, Finn A. Functional expression of chemokine receptor CXCR4 on human epithelial cells. *Immunology* 1999;98:36-41.
81. Murdoch C. CXCR4: chemokine receptor extraordinaire. *Immunol Rev* 2000;177:175-184.
82. Ohira S, Sasaki M, Harada K, Sato Y, Zen Y, Isse K, Kozaka K, Ishikawa A, Oda K, Nimura Y, Nakanuma Y. Possible regulation of migration of intrahepatic cholangiocarcinoma cells by interaction of CXCR4 expressed in carcinoma cells with tumor necrosis factor- α and stromal-derived factor-1 released in stroma. *Am J Path* 2006;168:1155-1168.
83. Okamoto R, Ueno M, Yamada Y, Takahashi N, Sano H, Suda T, Takakura N. Hematopoietic cells regulate the angiogenic switch during tumorigenesis. *Blood* 2005;105:2757-63.
84. Orimo A, Gupta PB, SgROI DC, Arenzana-Seisdedos F, Delaunay T, Naeem R, Carey VJ, Richardson AL, Weinberg RA. Stromal fibroblasts present in invasive human breast carcinomas promote tumor growth and angiogenesis through elevated SDF-1/CXCL12 secretion. *Cell* 2005; 121:335-348.

85. Ottaiano A, di Palma A, Napolitano M, Pisanco C, Pignata S, Tatangelo F, Botti G, Acquaviva AM, Castello G, Ascierto PA, Iaffaioli RV, Scala S. Inhibitory effects of anti-CXCR4 antibodies on human colon cancer cells. *Cancer Immunol Immunother* 2005;54:781-791.
86. Ottaiano A, Franco R, Aiello Talamanca A, Liguori G, Tatangelo F, Delrio P, Nasti G, Barletta E, Facchini G, Daniele B, Di Blasi A, Napolitano M, Ierano C, Calemme R, Leonardi E, Albino V, De Angelis V, Falanga M, Boccia V, Capuozzo M, Parisi V, Botti G, Castello G, Vincenzo Iaffaioli R, Scala S. Overexpression of both CXC chemokine receptor 4 and vascular endothelial growth factor proteins predicts early distant relapse in stage II-III colorectal cancer patients. *Clin Cancer Res*; 2006;12:2795-803.
87. Paget S. The distribution of secondary growths in cancer of the breast. 1889. *Cancer Metast Rev* 1998;8:98-101.
88. Pan J, Mestas J, Burdick MD, Phillips RJ, Thomas GV, Reckamp K, Belperio JA, Strieter RM. Stromal derived factor-1 (SDF-1/CXCL12) and CXCR4 in renal cell carcinoma metastasis. *Mol Cancer* 2006;5:56.
89. Panis Y, Ribeiro J, Chrétien Y, Nordlinger B. Dormant liver metastases: an experimental study. *Br J Surg* 1992;79:221-223.
90. Paschkis KE, Cantarow A, Stasney J, Hobbs JH. Tumor growth in partially hepatectomized rats. *Cancer Res* 1955;579-582.
91. Phillips RJ, Burdick MD, Lutz M, Belperio JA, Keane MP, Stierter RM. The stromal derived factor-1/CXCL12-CXC chemokine receptor 4 biological axis in non-small cell lung cancer metastases. *Am J Respir Crit Care Med* 2003;167:1676-1686.
92. Picardo A, Karpoff HM, Ng B, Lee J, Brennan MF, Fong Y. Partial hepatectomy accelerates local tumor growth: potential roles of local cytokine activation. *Surgery* 1998;124:57-64.
93. Plate KH, Breier G, Weich HA, Risau W. Vascular endothelial growth factor is a potential tumour angiogenesis factor in human gliomas in vivo. *Nature* 1992;359:845-848.
94. Raida M. Neue Substanzen bei soliden Tumoren. *Dtsch Med Wochenschr* 2006;131:2407-2410.
95. Rashidi B, An Z, Sun FX, Sasson A, Gamagammi R, Moossa AR, Hoffmann RM. Minimal liver resection strongly stimulates the growth of human colon cancer in the liver of nude mice. *Clin Exp Metastasis* 1999;17:497-500.
96. Rollins BJ. Chemokines. *Blood* 1997;90:909-928.

97. Romagnani P, Annunziato F, Lasagni L, Lazzeri E, Beltrame C, Francalanci M, Uguccioni M, Galli G, Cosmi L, Maurenzig L, Baggiolini M, Maggi E, Romagnani S, Serio M. Cell cycle-dependent expression of CXC chemokine receptor 3 by endothelial cells mediates angiostatic activity. *J Clin Invest* 2001;107:53-63.
98. Rottman JB. Key role of chemokines and chemokine receptors in inflammation, immunity, neoplasia, and infectious disease. *Vet Pathol* 1999;36:357-367.
99. Rupertus K, Kollmar O, Scheuer C, Junker B, Menger MD, Schilling MK: Major but not minor hepatectomy accelerates engraftment of extrahepatic tumor cells. *Clin Exp Metastasis* 2007;24:39-48.
100. Salcedo R, Oppenheim JJ. Role of chemokines in angiogenesis: CXCL12/SDF-1 and CXCR4 interaction, a key regulator of endothelial cell responses. *Microcirculation* 2003;10:359-370.
101. Salcedo R, Wasserman K, Young HA, Grimm MC, Howard OMZ, Anver MR, Kleinman HK, Murphy WJ, Oppenheim JJ. In vivo neovascularization induced by stromal-derived factor-1 α . *Am J Pathol* 1999;154:1125-1135.
102. Schindel DT, Grosfeld JL. Hepatic resection enhances growth of residual intrahepatic and subcutaneous hepatoma, which is inhibited by octreotide. *J Pediatr Surg* 1997;32:995-997.
103. Schneider GP, Salcedo R, Welniak LA, Howard OMZ, Murphy WJ. The diverse role of chemokines in tumor progression: prospect for intervention. *Int J Mol Med* 2001;8:235-244.
104. Scotté M, Masson S, Lyoumi S, Hiron M, Ténière P, Lebreton JP, Daveau M. Cytokine gene expression in liver following minor or major hepatectomy in rat. *Cytokine* 1997;9:859-867.
105. Seyama Y, Kubota K, Sano K, Noie T, Takayama T, Kosuge T, Makuuchi M. Long-term outcome of extended hemihepatectomy for hilar bile duct cancer with no mortality and high survival rate. *Ann Surg* 2003;238:73-83.
106. Shimizu H, Mitsuhashi N, Ohtsuka M, Ito H, Kimura F, Ambiru S, Togawa A, Yoshidome H, Kato A, Miyazaki M. Vascular endothelial growth factor and angiopoietins regulate sinusoidal regeneration and remodeling after partial hepatectomy in rats. *World J Gastroenterol* 2005;11:7254-7260.
107. Shirozu M, Nakano T, Inazawa J, Tashiro K, Tada H, Shinohara T, Honjo T. Structure and chromosomal localization of the human stromal cell-derived factor-1 (SDF-1) gene. *Genomics* 1995;28:495-500.
108. Slooter GD, Marquet RL, Jeekel J, Ijzermans JNM. Tumor growth stimulation after partial hepatectomy can be reduced by treatment with tumor necrosis factor α . *Br J Surg* 1995; 82:129-132.

109. Steinbauer M, Guba M, Cernaianu G, Köhl G, Cetto M, Kunz-Schughart LA, Geissler EK, Falk W, Jauch K-W. GFP-transfected tumor cells are useful in examining early metastasis in vivo, but immune reaction precludes long-term tumor development studies in immunocompetent mice. *Clin Exp Metast* 2003;20:135-141.
110. Stolz DB, Mars WM, Petersen BE, Kim TH, Michalopoulos GK. Growth factor signal transduction immediately after two-thirds partial hepatectomy in the rat. *Cancer Res* 1999;59:3954-3960.
111. Strieter RM, Belperio JA, Phillips RJ, Keane MP: CXC chemokines in angiogenesis of cancer. *Semin Cancer Biol* 2004;14:195-200.
112. Strieter RM, Poberini PJ, Kunkel SL, Arenberg DA, Burdick MD, Kasper J, Dzuiba J, Van Damme J, Walz A, Marriott D, Chan SY, Roczniak S, Shanafelt AB. The functional role of the ELR motif in CXC chemokine-mediated angiogenesis. *J Biol Chem* 1995;270:27348-27357.
113. Sturm JW, Keese MA, Petruch B, Bönninghoff RG, Zhang H, Gretz N, Hafner M, Post S, McCuskey RS. Enhanced green fluorescent protein-transfection of murine colon carcinoma cells: key for early tumor detection and quantification. *Clin Exp Metast* 2003;20:395-405.
114. Tachibana K, Hirota S, Iizasa H, Yoshida H, Kawabata K, Kataoka Y, Kitamura Y, Matsushima K, Yoshida N, Nishikawa S, Kishimoto T, Nagasawa T. The chemokine receptor CXCR4 is essential for vascularization of the gastrointestinal tract. *Nature* 1998;393:591-594.
115. Tannenbaum CS, Wicker N, Armstrong D, Tubbs R, Finke J, Bukowski RM, Hamilton TA. Cytokine and chemokine expression in tumors of mice receiving systemic therapy with IL12. *J Immunol* 1996;156:693-699.
116. Taub R. Liver regeneration: from myth to mechanism. *Nature Rev Mol Cell Biol* 2004;5: 836-847.
117. Tilton B, Ho L, Oberlin E, Loetscher P, Baleux F, Clark-Lewis I, Thelen M. Signal transduction by CXC chemokine receptor 4: stromal cell-derived factor 1 stimulates prolonged protein kinase B and extracellular signal-regulated kinase 2 activation in T-lymphocytes. *J Exp Med* 2000;3:313-324.
118. Tsuchiya Y, Sawada S, Yoshioka I, Ohashi Y, Matsuo M, Harimaya Y, Tsukada K, Saiki I. Increased surgical stress promotes tumor metastasis. *Surgery* 2003;133:547-555.
119. Vajkoczy P, Farhadi M, Gaumann A, Heidenreich R, Erber R, Wunder A, Tonn JC, Menger MD, Breier G. Microtumor growth initiates angiogenic sprouting with simultaneous expression of VEGF, VEGF receptor-2, and angiopoietin-2. *J Clin Invest* 2002;109:777-785.

120. Vajkoczy P, Menger MD, Goldbrunner R, Ge S, Fong TAT, Vollmar B, Schilling L, Ullrich A, Hirth KP, Tonn JC, Schmiedek P, Rempel SA: Targeting angiogenesis inhibits tumor infiltration and expression of the pro-invasive protein SPARC. *Int J Cancer* 2000; 87:261-268.
121. Vajkoczy P, Schilling L, Ullrich A, Schmiedek P, Menger MD. Characterization of angiogenesis and microcirculation of high-grade glioma: an intravital multifuorescence microscopic approach in the athymic nude mouse. *J Cereb Blood Flow Metab* 1998;18:510-520.
122. Vajkoczy P, Ullrich A, Menger MD. Intravital fluorescence videomicroscopy to study tumor angiogenesis and microcirculation. *Neoplasia* 2000; 2:53-61.
123. van Dale P, Galand P. Effect of partial hepatectomy on experimental liver invasion by intraportally injected colon carcinoma cells in rats. *Invasion Metastasis* 1988;8:217-227.
124. Vlahakis SR, Villasis-Keever A, Gomez T, Vanegas M, Vlahakis N, Paya CV. G Protein-coupled chemokine receptors induce both survival and apoptotic signaling pathways. *J Immunol* 2002;169:5546-5554.
125. Wang J, Shiozawa Y, Wang J, Wang Y, Jung Y, Pienta KJ, Mehra R, Loberg R, Taichman RS. The role of CXCR7/RDC1 as a chemokine receptor for CXCL12/SDF-1 in prostate cancer. *J Biol Chem* 2008;283:4283-4294.
126. Wang M, Bronte V, Chen PW, Gritz L, Panicali D, Rosenberg SA, Restifo NP. Active immunotherapy of cancer with a nonreplicating recombinant fowlpox virus encoding a model tumor associated antigen. *The Journal of Immunology* 1995;154:4685-4692.
127. Wang S, Liu H, Ren L, Pan Y, Zhang Y. Inhibiting colorectal carcinoma growth and metastasis by blocking the expression of VEGF using RNA interference. *Neoplasia* 2008;10:399-407.
128. Weiss L, Grundmann E, Torhorst J, Hartveit F, Moberg I, Eder M, Fenoglio-Preiser CM, Napier J, Horne CH, Lopez MJ, et al. Haematogenous metastatic patterns in colonic carcinoma: an analysis of 1541 necropsies. *J Pathol.* 1986;150:195-203
129. Weiss L. Comments on hematogenous metastatic patterns in humans as revealed by autopsy. *Clin Exp Metastasis.* 1992;10:191-199.
130. Yamamoto J, Shimida K, Kosuge T, Yamasaki S, Sakamoto M, Fukuda H. Factors influencing survival of patients undergoing hepatectomy for colorectal metastases. *Br J Surg* 1999;86:332-337.
131. Yang SX, Chen JH, Jiang XF, Wang QL, Chen ZQ, Zhao W, Feng YH, Xin R, Shi JQ, Bian XW. Activation of chemokine receptor CXCR4 in malignant glioma cells promotes the production of vascular endothelial growth factor. *Biochem Biophys Res Commun* 2005;335:523-528.

132. Yokoyama H, Goto S, Chen CL, Pan TL, Kawano K, Kitano S. Major hepatic resection may suppress the growth of tumours remaining in the residual liver. *Br J Cancer* 2000;83:1096-1101.
133. Zeelenberg IS, Ruuls-Van Stalle L, Roos E. The chemokine receptor CXCR4 is required for outgrowth of colon carcinoma micrometastases. *Cancer Res* 2003;63:3833-3839.
134. Zhang L, Yeger H, Das B, Irwin MS, Baruchel S. Tissue microenvironment modulates CXCR4 expression and tumor metastasis in neuroblastoma. *Neoplasia* 2007;9:36-46.
135. Zheng D, Oh SH, Jung Y, Petersen BE. Oval cell response in 2-acetylaminofluorene/partial hepatectomy rat is attenuated by short interfering RNA targeted to stromal cell-derived factor-1. *Am J Pathol.* 2006;169:2066-2074.

7. Dank

Die vorliegende Arbeit wurde in Kooperation mit der Klinik für Allgemeine Chirurgie, Viszeral-, Gefäß- und Kinderchirurgie des Universitätsklinikums des Saarlandes in Homburg/Saar (Direktor: Herr Prof. Dr. med. M. K. Schilling) und dem Institut für klinisch-experimentelle Chirurgie der Medizinischen Fakultät der Universität des Saarlandes in Homburg/Saar (Direktor: Herr Prof. Dr. med. M. D. Menger) durchgeführt.

Meinem Doktorvater, Herrn PD Dr. med. O. Kollmar danke ich für die Überlassung des Themas und für die außergewöhnlich gute Betreuung. Darüber hinaus danke ich ihm herzlich für seine Unterstützung bei der Ausarbeitung und Vorstellung eigener Publikationen und Vorträge im Rahmen dieses Forschungsprojektes, für sein stets offenes Ohr und für die unermüdliche Motivation.

Herrn Prof. Dr. med. M. D. Menger und Herrn Prof. Dr. med. M. K. Schilling, danke ich für die stets freundliche Unterstützung bei der Planung und Durchführung der Experimente, für die Hilfe bei der Interpretation der Daten und insbesondere für die vielen angeregten Diskussionen.

Mein besonderer Dank für die Durchführung der Transfektion, die kompetente Beratung im Umgang mit den Tumorzellen und die tatkräftige Unterstützung während der Versuche gilt Frau Dr. rer. med. C. Scheuer. Frau Dr. med. M. Amon und Herrn Dr. med. M. Laschke danke ich für ihre Ratschläge bezüglich der praktischen Durchführung der Tierexperimente und ihre Hilfestellung bei technischen Schwierigkeiten.

Frau J. Becker danke ich für die Anfertigung der histologischen und immunhistochemischen Präparate. Außerdem möchte ich mich bei Frau C. Marx für die stets zuverlässige Aufbereitung der Tumorzellen bedanken.

Publikationen

1. **Rupertus K**, Kollmar O, Scheuer C, Junker B, Menger MD, Schilling MK: Major but not minor hepatectomy accelerates engraftment of extrahepatic tumor cells. Clin Exp Metastasis 2007;24:39-48.
2. Kollmar O, **Rupertus K**, Scheuer C, Junker B, Tilton B, Schilling MK, Menger MD. Stromal cell-derived factor-1 promotes cell migration and tumor growth of colorectal metastasis. Neoplasia 2007;9:862-870.
3. Kollmar O, Junker B, **Rupertus K**, Scheuer C, Menger MD, Schilling MK. Liver resection-associated macrophage inflammatory protein-2 stimulates engraftment but not growth of colorectal metastasis at extrahepatic sites. J Surg Res. 2008;145:295-302.
4. Kollmar O, Junker B, **Rupertus K**, Menger MD, Schilling MK. Studies on MIP-2 and CXCR2 expression in a mouse model of extrahepatic colorectal metastasis. Eur J Surg Oncol 2007;33:803-11.
5. Kollmar O, **Rupertus K**, Scheuer C, Nickels RM, Haberl GCY, Tilton B, Menger MD, Schilling MK. Blockade of SDF-1 does not inhibit metastatic tumor growth after liver resection – activation of an alternative VEGF-dependent pathway, *in revision*.

Publizierte Abstracts

- 1a.) **Rupertus K**, Kollmar O, Scheuer C, Junker B, Dahlem C, Menger MD, Schilling MK. Major but not minor hepatectomy accelerates extrahepatic tumor growth by enhancing cell migration and neovascularization. Langenbecks Arch Surg 2006; 391:534.
- 1b.) **Rupertus K**, Scheuer C, Junker B, Menger MD, Schilling MK, Kollmar O. Erweiterte Leberresektion beschleunigt das Tumorwachstum kolorektaler extrahepatischer Metastasen durch gesteigerte Angiogenese und Zellmigration. Chir Forum 2007, Band 36: 131.
- 2a.) Kollmar O, Junker B, **Rupertus K**, Scheuer C, Menger MD, Schilling MK. MIP-2 induziert extrahepatisches Wachstum kolorektaler Metastasen über Induktion von Zellproliferation ohne Stimulation der Angiogenese. Chir Forum 2007; Band 36:23.
- 2b.) Kollmar O, **Rupertus K**, Scheuer C, Junker B, Tilton B, Schilling MK, Menger MD. Stromal cell-derived factor (SDF)-1 promotes tumor growth of colorectal metastases by acceleration of angiogenesis, induction of cell proliferation and inhibition of apoptosis. Langenbecks Arch Surg. 2007; 392:804-5.

- 2c.) Kollmar O, **Rupertus K**, Junker B, Scheuer C, Menger MD, Schilling MK. MIP-2 induces CXCR2 expression and promotes tumor cell proliferation but not vascularization of established extrahepatic colorectal metastases, whereas liver resection-associated MIP-2 stimulates engraftment but not growth of colorectal metastases at extrahepatic sites. *Langenbecks Arch Surg.* 2007; 392:811.
- 2d.) **Rupertus K**, Scheuer C, Haberl GCY, Junker B, Tilton B, Menger MD, Schilling MK, Kollmar O. Blockade of SDF-1 does not affect metastatic tumor growth due to activation of an alternative, CXCR4-VEGF-dependent pathway after liver resection. *Langenbecks Arch Surg.* 2007; 392:812.
- 3a.) **Rupertus K**, Scheuer C, Junker B, Tilton B, Schilling MK, Menger MD, Kollmar O. Blockade of SDF-1 does not affect metastatic tumor growth due to activation of an alternative CXCR-4 - VEGF-dependent pathway after liver resection. *Onkologie* 2008; 31 Suppl.1:54.
- 3b.) Kollmar O, **Rupertus K**, Scheuer C, Junker B, Tilton B, Schilling MK, Menger MD. Stromal cell-derived factor (SDF)-1 promotes cell migration and tumor growth of colorectal metastasis. *Onkologie* 2008; 31 Suppl.1:56-57.
- 3c.) **Rupertus K**, Haberl GCY, Scheuer C, Tilton B, Schilling MK, Menger MD, Kollmar O. Bone marrow suppression enhances tumor growth of colorectal metastasis due to stromal cell-derived factor (SDF)-1 related stimulation of angiogenesis and tumor cell proliferation. *Onkologie* 2008; 31 Suppl.1:61.
- 4.) Kollmar O, **Rupertus K**, Scheuer C, Junker B, Tilton B, Schilling MK, Menger MD. Stromal cell-derived factor (SDF)-1 fördert das Wachstum von kolorektalen Metastasen durch Beschleunigung der Angiogenese, Induktion der Tumorzellproliferation und Inhibition der Apoptose. *Chir Forum* 2008; Band 37:41-42.
- 5.) Haberl GCY, **Rupertus K**, Scheuer C, Tilton B, Schilling MK, Menger MD. Das durch Knochenmarkssuppression verstärkte Wachstum von kolorektalen Metastasen wird über Stromal cell-derived factor (SDF)-1 durch Beeinflussung der Angiogenese und Induktion der Tumorzellproliferation vermittelt. *Chir Forum* 2008; Band 37:55-56.
- 6.) **Rupertus K**, Scheuer C, Junker B, Tilton B, Schilling MK, Menger MD, Kollmar O. Die Blockade von SDF-1 nach Leberresektion hat aufgrund eines zusätzlich aktivierten CXCR4/VEGF-abhängigen Signalwegs keinen Einfluss auf das metastatische Tumorstadium. *Chir Forum* 2008; Band 37:57-58.
- 7.) **Rupertus K**, Corsten M, Schilling MK, Menger MD, Kollmar O. Darbepoetin promotes angiogenesis and growth of intrahepatic colorectal metastases after liver resection. *Langenbecks Arch Surg.* 2008; 393:760.

- 8.) **Rupertus K**, Haberl GCY, Schilling MK, Menger MD, Kollmar O. Blockade of endothelial precursor cells enhances tumor growth of colorectal metastases due to stromal cell-derived factor (SDF)-1 related stimulation of angiogenesis and tumor cell proliferation. *Langenbecks Arch Surg.* 2008; 393:775.

8. Lebenslauf

Kathrin Rupertus

Geburtsdatum/-ort: 01.05.1981 in Quierschied,
Eltern: Elisabeth und Wolfgang Rupertus
Adresse: Bogenstraße 10, 66424 Homburg/Saar

Schulbildung und Hochschulstudium

1987 – 1991: Grundschule: Pestalozzischule in Spiesen-Elversberg
1991 – 2000: Privates Albertus-Magnus-Gymnasium in St.Ingbert
10/2000 – 04/2007: Medizinstudium an der Medizinischen Fakultät der Universität des Saarlandes
09/2002: Physikum
08/2003: 1. Staatsexamen
03/2006: 2. Staatsexamen
04/2007: 3. Staatsexamen
06/2007: Approbation als Ärztin

Praktisches Jahr

04/2006 – 08/2006 PJ-Abschnitt in der Klinik für Neurologie des Universitätsklinikums des Saarlandes in Homburg – Prof. Dr. med. K. Fassbender
08/2006 – 10/2006 PJ-Abschnitt in der Medizinischen Klinik II des Universitätsklinikums des Saarlandes in Homburg – Prof. Dr. med. S. Zeuzem
10/2006 – 12/2006 PJ-Abschnitt in der Medizinischen Klinik I des Universitätsklinikums des Saarlandes in Homburg – Prof. Dr. med. M. Pfreundschuh
12/2006 – 03/2007 PJ-Abschnitt in der Chirurgie Générale A des Hôpital Civil de Strasbourg, Centres Hospitaliers Universitaires (C.H.U.) der Université Louis Pasteur Strasbourg, Frankreich – Prof. Dr. med. J. Marescaux

Beruflicher Werdegang

seit 07/2007 Assistenzärztin in der Klinik für Allgemeine Chirurgie, Viszeral-, Gefäß- und Kinderchirurgie des Universitätsklinikums des Saarlandes, Homburg/Saar – Direktor: Herr Prof. Dr. med. M. K. Schilling